PARIJS

FACULTE DE MEDECINE XAVIER BICHAT

37.

1973

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

Par

Jacques GIRODET

Interne des Hopitaux de Paris
Né le 16 novembre 1944

Présentée et soutenue publiquement le

ETUDE BIOCHIMIQUE ET MORPHOLOGIQUE DES LYSOSOMES DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE DU RAT.

Président : Professeur S. BONFILS

FACULTE DE MEDECINE XAVIER BICHAT

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

Par

Jacques GIRODET

Interne des Hopitaux de Paris
Né le 16 novembre 1944

Présentée et soutenue publiquement le

ETUDE BIOCHIMIQUE ET MORPHOLOGIQUE DES LYSOSOMES DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE DU RAT.

Président : Professeur S. BONFILS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma Femme,

A mon Fils,

A tous les miens.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544721_0051

A Monsieur le Professeur S. BONFILS

qui, en nous proposant ce travail, nous a fait découvrir tout l'attrait de la recherche médicale et qui nous a fait l'honneur de présider cette thèse.
Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur R. FAUVERT

qui nous a enseigné la rigueur scientifique appliquée aux Sciences Médicales et qui nous a chaleureusement accueilli dans son Service.

Au Docteur B. RUEFF,

toute mon admiration et toute mon amitié.

A mes Maîtres de l'Externat

Monsieur le Professeur M. FEVRE
Monsieur le Professeur E. AZERAD
Monsieur le Professeur R. FAUVERT
Monsieur le Professeur G. BOUDIN

A mes Maîtres de l'Internat

Monsieur le Professeur R. DUPUY
Monsieur le Professeur Agrégé P. JOLIS
Monsieur le Professeur JJ. BERNIER
Monsieur le Docteur M. MORIN
Monsieur le Professeur Agrégé H. NAHUM
Monsieur le Professeur S. BONFILS

Au Département de Biologie Cellulaire de l'Unité de Recherches de Gastroentérologie, U. 10 de l'INSERM, et plus particulièrement

A Monsieur M. LEWIN

qui nous a patiemment guidé sur les chemins de la Biologie, qu'il en soit remercié,

A Madame A.M. CHERET
Madame A. SOUMARMON
qui nous ont toujours aidé de leurs précieux conseil

A Mademoiselle F. HEBING
Madame D. GHESQUIER
Mademoiselle C. BOTTIN
Monsieur J.C. HOUDEMENT

dont l'aide technique fut pour nous inestimable,

Et à tous les membres de l'Unité de Recherches.

INTRODUCTION

Les lysosomes représentent un groupe particulier d'organites intracellulaires renfermant un certain nombre d'hydrolases acides. L'activité de ces hydrolases normalement maintenus à l'état latent grâce à la relative imperméabilité de la membrane qui sépare ces enzymes de leurs substrats, n'est mise en jeu qu'au cours du processus de digestion intracellulaire.

Ce travail se propose d'étudier, dans la muqueuse fundique du rat normal, l'activité de différentes hydrolases acides leur association à un même type d'organite et leur localisatio cellulaire.

A l'origine le terme de "lysosome" fut proposé par Ch. DE DUVE (4) pour désigner des organites cytoplasmiques présents dans les cellules hépatiques et doués de propriétés biochimiques suffisament particulières pour justifier leur distinction des autres structures subcellulaires.

C'est en étudiant les propriétés de certaines hydrolases acides, et en particulier la phosphatase acide, dans des homogénats de foie de rat que DE DUVE constata une activité enzymatique beaucoup plus faible lorsque l'homogénat était réalisé dans des conditions, notamment de molarité, préservant au maximum l'intégrité des organites subcellulaires. La recherche des différents facteurs pouvant influencer l'activité de ces hydrolases a conduit à la conclusion que dans la cellule intacte les hydrolases acides sont contenues dans des organites dont la membrane constitue une barrière entre les enzymes et le reste de la cellule. Lorsque cette membrane est lésée, les hydrolases sont libérées dans le milieu et deviennent accessibles à leurs substrats. Les moyens utilisés pour "activer" les enzymes lysosomiaux ont été décrits par BEAUFAY et DE DUVE (13), ils comprennent essentiellement : la rupture mécanique par homogénéisation brutale, la congélation-décongélation, les chocs osmiques, la modification de la membrane par des détergents tels les sels biliaires ou le Triton X-100, enfin l'autolyse par incubation à 37°C. La localisation des hydrolases acides dans des structures subcellulaires particulières a été démontrée par l'utilisation de la technique de centrifugation différentielle. Dans les premières expériences de fractionnement subcellulaire réalisées par CLAUDE (21) les hydrolases acides sédimentaient avec la fraction mitochondriale, mais en modifiant le schéma de centrifugation, DE DUVE (24) put montrer que cinq hydrolases acides : la phosphatase acide, la β-glucuronidase, la cathepsine, la ribonucléase acide et la désoxyribonucléase acide possédaient des caractéristiques de sédimentations différentes des enzymes mitochondriaux tels que la cytochrome oxydase.

...

Le concept biochimique du lysosome a donc précédé son identification morphologique.

Une méthode histochimique de révélation de la phosphatase acide avait été décrite par GOMORY (39, 40) et HOLT (51). Ce dernier avait décrit la localisation de l'enzyme sous forme de "gouttelettes" dans le tubule proximal du rein. Plus tard, d'autres petits granules colorés par cette réaction devaient être démontrés dans le cytoplasme de nombreuses autres cellules (67).

Enfin l'examen au microscope électronique de fractions riches en lysosomes obtenues à partir d'homogénats de foie, permit à NOVIKOFF, BEAUFAY et DE DUVE (66) d'y déceler une proportion relativement importante de granules assez opaques aux électrons dotés d'une membrane unique, à peu près sphériques d'un diamètre approximatif de 0,4 micron, qu'ils rapprochèrent des "dense bodies" décrits antérieurement autour des canalicules biliaires.

L'application de la réaction histochimique de la phosphatase acide, puis d'autres hydrolases acides, en microscopie électronique a permis l'identification des lysosomes dans la plupart des cellules animales (83), y compris les cellules pariétales de la muqueuse gastrique (94). Le lysosome présente un grand polymorphisme en rapport avec son activité dans la cellule. HAYASHI (43) a démontré que dans des tissus différents, et probablement aussi dans un même tissu, chaque lysosome peut avoir un équipement enzymatique quantitativement et aussi probablement qualitativement différent.

Actuellement on connait une quarantaine d'enzymes lysosomiaux. Ce sont tous des hydrolases dont la plupart ont un pH optimum acide, et qui agissent sur presque tous les types de liaisons chimiques connus en biologie.

...

Un tel équipement enzymatique suggère de toute évidence que l'activité des lysosomes s'exerce dans le domaine du catabolisme. Ils forment un puissant système de digestion intracellulaire capable de dégrader d'une manière poussée tous les constituants majeurs des cellules et des tissus (fig. 1).

La digestion des substrats extracellulaires met en jeu soit des invaginations, soit des émissions diverses de la membrane plasmique aboutissant à englober à l'intérieur du cytoplasme une quantité plus ou moins importante de matériel étranger. La vacuole ainsi formée par endocytose dénommée "phagosome" est considérée comme un "prélysosome" dépourvu d'enzymes digestifs (15). Le stade ultérieur par lequel se déclenche la digestion du matériel endocyté peut se présenter sous des apparences très différentes selon le type cellulaire, tout en dépendant du même processus fondamental :

- Chez certains protozoaires il y a formation quasi continue de lysosomes primaires dont le contenu est déversé dans les vacuoles de phagocytoses qui se transforment ainsi en vacuoles digestives (15). Les produits de la digestion sont absorbés dans le cytoplasme et les résidus sont éliminés par la défécation cellulaire.

- Chez les leucocytes polymorphonucléaires, les phénomènes ont lieu d'une manière plus discontinue (48) : au cours de la maturation de ces cellules il se produit une accumulation d'hydrolases acides dans les lysosomes primaires qui sont les granulations caractéristiques des leucocytes. Cette longue préparation aboutit à une étape phagocytaire probablement unique au cours de laquelle les enzymes stockés sont déversés d'une manière massive dans les vacuoles de phagocytose (22).

- Dans beaucoup d'autres cellules, les phénomènes sont nettement moins ordonnés ; les vacuoles digestives ou lysosomes secondaires n'y évoluent pas irréversiblement vers l'étape finale de la défécation mais persistent au contraire dans les cel-

lules durant un temps prolongé au cours duquel ils participent à de multiples échanges dynamiques avec des phagosomes, les lysosomes primaires et d'autres lysosomes secondaires.

La portion de lysosomes primaires dans la population totale des lysosomes d'une cellule peut varier d'un type cellulaire à l'autre. Cependant on admet que la plupart des cellules élaborent des lysosomes primaires, à un rythme qui est lié notamment à l'intensité des phénomènes d'endocytose et à la vitesse avec laquelle les enzymes des lysosomes sont inactivés ou éliminés. La synthèse des hydrolases acides a lieu, comme celle des protéines destinées à l'exportation, au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique (3). Les enzymes néoformés apparaissent d'abord dans les éléments du réticulum endoplasmique rugueux, puis passent par les éléments lisses du réticulum et par l'appareil de Golgi (45, 68) ; les lysosomes primaires étant souvent proches du Golgi dans certains types cellulaires (67,69)

Lorsque le matériel ingéré est d'origine endocellulaire la première structure visible est un cytolysome (6) structure pour laquelle DE DUVE a proposé le nom de vacuole autophagique, et ERICSSON (33) celui de Cytoségrésome. La formation de ces vacuoles semble survenir comme si une zone limitée du cytoplasme se trouvait soudain séquestrée à l'intérieur de la cellule, entourée d'une membrane de structure plus ou moins complexe, et traitée comme un corps étranger endocyté. Les observations microscopiques ne permettent pas de préciser la séquence des événements qui peuvent s'intérpréter de deux façons :

- A la suite d'une lésion locale, peut être causée par la rupture d'un lysosome, la zone atteinte s'entourerait de membranes formées spontanément à partir d'éléments disséminés du cytoplasme (6).

- Ou bien une ou plusieurs vésicules pré-existantes entoureraient en se fusionnant, une zone limitée du cytoplasme, formant ainsi une vésicule présentant initialement une membrane double (70), la membrane interne privée des échanges normaux

avec le reste de la cellule disparaitrait pour ne plus laisser que l'aspect de la vésicule limitée par une membrane simple caractéristique des lysosomes. Les faits connus sont compatibles avec ces deux hypothèses, mais la plupart des auteurs penchent en faveur de la seconde (94).

Si de nombreuses cellules sont capables d'autophagie on doit se demander quelle est la signification physiologique du phénomène. Les divers constituants figurés du cytoplasme sont inclus dans des vacuoles autophagiques sans grande discrimination. Le processus ne peut donc être le seul responsable de la dégradation de tous les éléments cytoplasmiques qui ont des taux de renouvellement différents (71). Même si la formation de vacuoles autophagiques n'est, dans les circonstances habituelles, qu'un processus peu fréquent, on voit l'avantage que la cellule pourrait tirer d'un mécanisme occasionnel non spécifique : il permet d'assurer un renouvellement lent des éléments pour lesquels aucun procédé spécifique de destruction n'est prévu ; il assure une séquestration suivie de destruction des zones cytoplasmiques anormales.

Certains matériaux non digestibles restent dans les lysosomes. Chez les protozoaires et dans certains types cellulaires des animaux supérieurs, les lysosomes ainsi chargés peuvent être vidangés de leur contenu par exocytose. Lorsque cette exocytose ne se fait pas, la surcharge du cytoplasme en corpuscules résiduels est peut être la cause première de la mort de la cellule (76). On peut poser en principe que toute cellule qui phacocyte assez activement doit soit éliminer des corpuscules résiduels, soit mourir jeune ; cette dernière éventualité étant sans doute la plus fréquente, c'est le cas notamment des leucocytes polymorphonucléaires. Certaines cellules épithéliales à renouvellement lent, comme les cellules parenchymateuses hépatiques, ont conservé la capacité d'exocytose : en effet des produits "indigestes" comme le triton WR-1339 en disparaissent lentement, mais plus vite que les cellules ne se renouvellent (15).

...

Dès le début de ses recherches sur les hydrolases acides DE DUVE a attiré l'attention sur la séparation imposée par la membrane du granule entre les hydrolases lysosomiales et les substrats extérieurs. Il est devenu de plus en plus évident qu'il s'agit là d'un des procédés essentiels par lequel la cellule limite le pouvoir lytique des hydrolases qu'elle contient.

Un corollaire évident de cette théorie est que la rupture de la membrane lysosomiale doit provoquer de graves phénomènes autolytiques intracellulaires, voire même la mort de la cellule. Cette rupture intervient par fragilisation de la membrane du lysosome. Parfois cette lésion peut être une conséquence directe de l'activité hétérophagique de la cellule. Les travaux de HIRSCH et WEISSMANN démontrent cette hypothèse : les streptolysines qui ont in vitro un effet lytique sur les lysosomes provoquent l'éclatement des granulations des leucocytes polymorphonucléaires et la mort de la cellule (49).

Egalement ALLISON a montré que les macrophages alvéolaires sont endommagés dans un certain nombre de pneumoconioses à la suite d'une interaction entre les particules de silice ingérées de la membrane lysosomiale (2).

Les conséquences précises de la rupture intracellulaire des lysosomes ne sont pas connues. Sans doute le phénomène conduit à la mort cellulaire s'il est suffisamment massif. S'il est plus discret des lésions non léthales peuvent être infligées. ALLISON a souligné la possibilité de cassures chromosomiques causées par la DNase lysosomiale (2), tandis que WEISSMA croit que les protéases lysosomiales peuvent provoquer la déréppression de certains gènes (50).

Les hydrolases lysosomiales sortent généralement des cellules mortes ou très altérées dont les lysosomes ont été lésés, mais on connait des situations où des cellules intactes excrètent des enzymes lysosomiaux (30). Il se produit alors une digestion des structures extracellulaires pour autant que

...

que les hydrolases ne soient pas rapidement inactivées ou éloignées mécaniquement. L'hypervitaminose A provoque une dissolution complète de la matrice de cartilage embryonnaire en culture sous l'influence d'enzymes libérés à partir des lysosomes (29, 34). On retrouve le même mécanisme dans la résorption du tissu osseux stimulé par l'hormone parathyroidienne.

Des phénomènes de ce genre jouent probablement un rôle important dans les lésions arthritiques et dans d'autres affections dégénératives ainsi que dans le phénomène de l'inflammation. L'effet anti inflammatoire de la cortisone s'expliquant en partie par son action stabilisatrice sur la membrane des lysosomes (25, 92).

La digestion intra cellulaire peut être modifiée soit par excès de produits ingérés soit par insuffisance d'excrétion ou de dégradation de ces produits.

Expérimentalement, de nombreux procédés permettent de provoquer un "engorgement" des lysosomes. C'est le cas après administration de Dextran (23), de triton WR-1339 (91) ou de saccharose (18).

Les thésorismoses congénitales sont un aspect caractéristique de la surcharge des lysosomes. HERS a apporté la preuve de la déficience d'un enzyme lysosomial dans la glycogénose de type II (maladie de Pompe) (46). Cette maladie se caractérise biochimiquement par l'absence congénitale d'une glucosidase normalement associée aux lysosomes, et morphologiquement par la formation d'énormes vacuoles remplies de glycogène (9). Depuis l'élucidation de la pathogénie de la glycogénose de type II par HERS, une douzaine de telles affections sont connues actuellement comme étant des maladies lysosomiales congénitales maladie de NIEMANN-PICK, de GAUCHER, de FABRY, de TAY-SACHS, de WOLMAN, certaines formes de maladies de HURLER , gangliosidoses généralisées, leucodystrophie métachromatique, etc.(47).

...

Dans chaque cas le défaut primaire est une déficience de l'une des hydrolases lysosomiales. Toutes les substances pénétrant dans les lysosomes dont la digestion ultérieure exigerait l'enzyme déficient s'accumulent sur place, les lysosomes augmentent considérablement de volume jusqu'à occuper une grande proportion du volume total de la cellule. Il s'ensuit des troubles graves spécialement au niveau du système nerveux central où le renouvellement cellulaire n'existe pas.

Cependant dans la plupart des cellules l'accumulation lente de résidus indigestes dans les lysosomes est presque inévitable. La surcharge progressive des lysosomes apparait ainsi comme un phénomène inhérent au vieillissement. Il se pourrait qu'il joue un rôle significatif dans la sénescence cellulaire, spécialement dans les cellules qui ne se divisent pas. La lipofuscine, ou "pigment de vieillesse", est un constituant caractéristique des lysosomes des cellules vieillissantes.

Ainsi le système lysosomial existe dans tous les types cellulaires étudiés et y fonctionne comme un système digestif intra cellulaire. Les différents types cellulaires de la muqueuse gastrique n'échappent pas à cette règle. La participation des lysosomes à la pathologie gastrique aigue ou chronique est un vaste domaine encore pratiquement inexploré.

oOo

I. ETUDE BIOCHIMIQUE

Le concept de lysosome a été initialement formulé sur la base de considérations biochimiques (4). Le mérite de sa découverte doit être essentiellement attribué aux travaux de biologie cellulaire de CLAUDE et de DE DUVE. Leurs techniques restent, à nos yeux, une référence en ce domaine.

L'identification biochimique d'un lysosome n'est établie d'une manière ferme que si l'on a démontré les points suivants

- l'association topologique de plusieurs hydrolases acide à un type particulier de granules cytoplasmiques limités par une membrane imperméable à la fois à ces hydrolases et à la majorité des substrats vis à vis desquels ces enzymes sont actifs

- La sensibilité de cette association à des agents capables de détruire les membranes, c'est à dire la mise en évidence du caractère latent de l'activité enzymatique.

Le fractionnement subcellulaire, initialement mis au poin par A. CLAUDE en 1946 (20, 21) sur le foie de rat a été considérablement développé par la suite par le groupe de Louvain (DE DUVE et ses collaborateurs : 4, 12, 24).

L'essentiel de la technique repose sur la possibilité de séparer dans un champ centrifuge les populations d'organites homologues mélangés dans un homogénat de tissu. Ce champ met en jeu la masse d'Archimède $\mu = V\ (d_1 - d_2)$ où V et d_1 sont respectivement le volume et la densité apparente de la

...

particule, d_2 la densité du milieu d'homogénéisation au voisinage de celle-ci. La centrifugation différentielle en milieu homogène est réalisée dans des conditions telles que la densité du milieu d'homogénéisation est inférieure à la densité de la moins dense des particules. Dans ces conditions le terme $(d_1 - d_2)$ ne s'annule jamais et pour une particule donnée le déplacement est directement proportionnel à sa taille. La centrifugation en gradient de densité, au contraire, est réalisée dans un milieu de densité croissante où chaque particule atteint plus ou moins vite selon sa taille, son niveau d'équilibration isopycnique $(d_1 = d_2)$. Ce niveau définit pour une particule donnée une densité apparente déterminée par sa structure (membrane) et son contenu (lysosomes, grains de sécrétion).

Le fractionnement subcellulaire est essentiellement guidé par des critères biochimiques, mais l'apparence morphologique des fractions est corrélativement examinée au microscope électronique. Les critères biochimiques directeurs reposent sur l'utilisation d'enzymes marqueurs à l'aide des deux postulats suivants :

. il est possible de faire correspondre à un enzyme marqueur donné une structure subcellulaire définie (postulat de la localisation unique),

. les organites d'une population donnée ne peuvent pas être séparés en sous-groupes différant significativement par leur contenu enzymatique relatif (postulat de l'homogénéité enzymatique).

ENZYMES LYSOSOMIAUX ETUDIES

1.- Phosphatase Acide EC 3.1.3.2.
2.- β-Glucuronidase EC 3.2.1.31.
3.- Ribonucléase EC 2.7.7.16.
4.- Hyaluronidase EC 3.2.1.35.

...

I.- PHOSPHATASE ACIDE (EC 3.1.3.2., orthophosphorique monoester phosphohydrolase).

Les préparations de tissus de mammifères hydrolysent de nombreux monoesters phosphoriques en milieu acide. On pensa d'abord qu'un seul enzyme non spécifique agissait, mais au cours de ces dernières années un certain nombre d'activités enzymatiques plus spécifiques ont été démontrées.

Si la localisation lysosomiale de la phosphatase acide fait partie de la définition même du concept de lysosome, il a été montré que la phosphatase acide peut aussi se rencontrer, en dehors du lysosome typique, au niveau de réticulum endoplasmique (1, 64, 65).

Les méthodes de dosage habituellement utilisées mesurent la libération de Phosphore inorganique à partir de différents substrats, le plus souvent le β-glycéro-2-Phosphate. Un autre groupe de méthodes consiste en l'hydrolyse du paranitrophényl phosphate : on mesure spectrophotométriquement le nitrophénol libéré (32, 19).

SAWANT et coll. ont obtenu une activité maximum sur un enzyme lysosomial de foie de rat sur le p. nitrophényl-Phosphate à pH 5,4 (77), tandis que CHERSI trouvait une activité maximum à pH 3,0 - 4,8 avec un enzyme extrait de la rate de boeuf (19), et DIPIETRO trouvait un optimum à pH 4,0 - 4,4 avec un enzyme placentaire humain (32).

La prostate contient certainement une phosphatase acide lysosomiale, mais une part importante de l'enzyme existant dans le tissu est située dans des vésicules sécrétoires de nature peut-être distincte. L'enzyme de prostate hypertrophique humaine a un poids moléculaire d'environ 109.000. Le tartrate est un inhibiteur compétitif et l'enzyme est également inhibé par le Fluor (80).

...

SMITH et WHITEY (79) ont différencié plusieurs isoenzymes d'activité identique à partir de la prostate humaine. L'activité p-Nitrophényl-phosphatasique du tissu, à pH acide, peut être attribuée à un type d'enzyme inhibé par le tartrate (5 mM). La vitesse de migration électrophorétique des isoenzyme les plus rapide est diminuée après traitement par la Neuraminidase, ce qui suggère qu'ils diffèrent essentiellement par leur contenu en acide sialique. Tous les types d'enzymes, sur Séphadex G 200, forment un seul pic de poids moléculaire 105.000 environ.

Chez l'homme la Phosphatase acide prostatique est très semblable, sinon identique à celle trouvée dans les lysosomes d'autres tissus. Le poids moléculaire de la phosphatase acide des lysosomes du foie de rat est de 100.000 - 120.000 (53) et de 105.000 dans le placenta humain (32). Elle est inhibée par le mercure (Hg^{++}) , le p-chloromercuribenzoate, les autres métaux lourds à des concentrations d'ordre de 10^{-6}M, le molybdate et le 1-naphtol-phosphate (90). Il se produit une inactivation oxydative de l'enzyme à l'air par modification de certains groupes thiols (90), quoique les phosphatases ne seraient en général pas touchées par les agents thiols-bloquants (80).

Les propriétés de l'enzyme purifié considéré comme lysosomial préparé à partir de rate de boeuf (77) sont très voisines de la phosphatase acide prostatique humaine. IGARASHI et HOLLANDER (53) ont obtenu une phosphatase acide cristallisée à partir du foie de rat. Cet enzyme d'un poids moléculaire de 100.000 environ existe sous deux formes de points isoélectriques différents (7 et 4,5). Ces deux formes ont des activités identiques et sont d'origine lysosomiales.

...

2.- β-GLUCURONIDASE (EC 3.2.1.31 β D Glucuronide Glucuronohydrolase).

La répartition intracellulaire de la β-glucuronidase est à la fois lysosomale et réticulo-endoplasmique, ceci a été démontré par les études de DE DUVE (24) et les travaux d'histochimie de FISHMAN et coll (35).

Les substrats habituels de la détermination de l'activité β-glucuronidasique sont le Phénolphtaléine - β-D-Glucosiduronate et le p-Nitrophényl-β-D-glucosiduronate. La quantité d'aglycone libéré par hydrolyse est mesurée colorimétriquement en milieu alcalin.

La glucuronidase détache le résidu terminal non réducteur de l'acide glucuronique. Son activité maximum est obtenue à pH 4,3 dans le foie humain (63), à pH 5,2 dans le coeur de boeuf (74). Le citrate et le phosphate sont inhibiteurs, notamment à pH acide (63, 74), ainsi que l'acétate mais à des concentrations relativement élevées (57).

L'enzyme est également puissamment inhibé par certains lipides comme le cholestérol, le β-Carotène et le rétinol (74). On pense que ces corps dissocient la molécule de l'enzyme en sous unités inactives.

La source la plus riche en glucuronidase est la glande préputiale du rat femelle (59). La hyaluronidase de foie humain a été purifiée par chromatographie échangeuse d'ions (63).

Le poids moléculaire de la β-glucuronidase bovine est estimé à 160.000 - 290.000 (74) alors que pour le foie humain (63) et le rein de rat (73) et le cerveau de lapin (36) on l'estime à 218.000, 210.000 et 266.000 respectivement.

...

3.- RIBONUCLEASE (EC 2.7.7.16. ribonucléate pyrimidinucléotide-2'-Transférase).

Dans le pancréas il existe une Ribonucléase non lysosomale qui transfère un groupe phosphate de la position 5' d'un nucléotide à la position 2' d'un autre formant un diester-phosphate 2' - 3' cyclique qui est lentement hydrolysé. On pense que la ribonucléase lysosomale aurait un mode d'action analogue (8).

La mesure de l'activité enzymatique peut se faire par mesure directe des variations d'absorption en ultra-violet qui surviennent au cours de la réaction, ou par détermination des oligonucléotides libérés solubles dans l'acide perchlorique après précipitation de l'ARN non dégradé par l'acétate d'Uranyl (55,28

La ribonucléase est présente dans les lysosomes du foie et d'autres organes (17, 24, 88).

Le pH optimum de la ribonucléase varie avec le substrat et les conditions de dosage : MAVER et GRECO (61) et DELANEY (27) trouvent un maximum d'activité à pH 6,5 - 5,7 , tandis que DERNARDI (14) trouve une activité maximum à pH 5,4 avec un enzyme purifié de rate de porc sur de l'ARN soluble.

Le poids moléculaire de la ribonucléase isolée par DELANEY est de 18.000 (27). Elle est thermolabile (14). L'enzyme est aussi actif sur l'ARN soluble que l'ARN ribosomal des levures.

...

4.- HYALURONIDASE (EC 3.2.1.35. hyaluronate glucanohydrolase).

La hyaluronidase rompt la liaison β (1⟶4) N-Acétyl-glucosamine de l'acide hyaluronique, du chondroïtine -4-Sulfate et du chondroïtine-6-Sulfate.

BOLLET et Coll (16) ont établi l'existence d'une hyaluronidase dans des tissus de mammifères autres que les testicules, première source reconnue, avec une méthode mesurant la libération de groupes réducteurs N-Acétyl-hexosamines. ARONSON et DAVIDSON (5) ont confirmé l'application de cette méthode à l'acide hyaluronique. Enfin la hyaluronidase lysosomiale a été mesurée par viscosimétrie par VAES (85).

La hyaluronidase lysosomiale a été démontrée dans les os de rat (86), le foie de rat (5, 82), la glande sous maxillaire du chien (84) mais une hyaluronidase non lysosomiale existe dans beaucoup de tissus dont le poumon, le foie, la rate, les artères (16).

La hyaluronidase lysosomiale du foie de rat purifiée par ARONSON et coll. (5) a un poids moléculaire de 89.000.

L'acide hyaluronique est hydrolysé par différentes hyaluronidases avec un maximum d'activité à un pH entre 3,5 et 4,1 (5, 7, 52). D'autres substrats sont moins spécifiques tels les chondroïtines 4 et 6 sulfate, les chondromucoprotéines (52). Certains polysaccharides tels l'héparine, le kératan sulfate, peuvent être inhibiteurs, et il semble que le NaCl supprime cet effet inhibiteur (5).

...

MATERIEL ET METHODES

A.- MATERIEL D'ETUDE

Les animaux, rats mâles de race Wistar CF (géniteur CNRS) d'un poids moyen de 200 à 220 g, ne sont pas soumis à un jeûne préalable, mais sont toujours sacrifiés aux mêmes heures.

Trente à 40 animaux sont utilisés pour chaque fractionnement. Un nombre plus faible d'animaux (de 4 à 6) est utilisé lorsqu'une seule activité enzymatique est dosée séparément. Le prélèvement, l'homogénéisation et le fractionnement de la muqueuse gastrique sont effectués à 0-4°C. On utilise au cours de ces opérations les milieux suivants :

- solution A : saccharose 0.25 M , Imidazol 30 mM, NCl pH 7.4
- solution B : saccharose 0.25 M, Imidazol 3 mM, NCl pH 7.4

1°- Recueil des muqueuses gastriques.

Les animaux sont assomés, l'estomac prélevé immédiatement et ouvert selon la grande courbure, est lavé (solution A). La muqueuse de la partie fundique est prélevée par raclage (lame de verre) en chambre froide et recueillie dans un becher contenant 5 à 10 ml de solution de saccharose (solution B).

2°- Préparation de l'homogénat.

La muqueuse est découpée aux ciseaux et passée à l'homogénéiseur de Potter Evelhjem (THOMAS, Philadelphia, USA) à 1800 tours par minute (4 allers, 3 retours). Le surnageant est prélevé ; le culot réhomogénéisé (4 allers - 4 retours) est réuni au surnageant ; l'ensemble constitue l'homogénat.

...

3°- Préparation et définition des fractions subcellulaires.

Nous avons choisi comme marqueurs de référence les composés biochimiques suivants : ADN (Noyaux), Cytochrome oxydase (Mitochondries), 5'Nucléotidase et ARN (membranes plasmiques et réticulum endoplasmique). Par rapport à ces enzymes, les hydrolases acides étudiées doivent situer la fraction lysosomiale.

- Centrifugation différentielle en milieu homogène. Elle est réalisée en milieu Sucrose 0.25 M tamponné à l'Imidazole-HCl 3 mM, pH 7,4 selon le protocole défini dans le schéma ci-joint. "L'extrait" correspond au surnageant de la première centrifugation : 1400 rpm 6 mn (soit 2240 g x min), dont le culot constitue la fraction "Nucléaire".

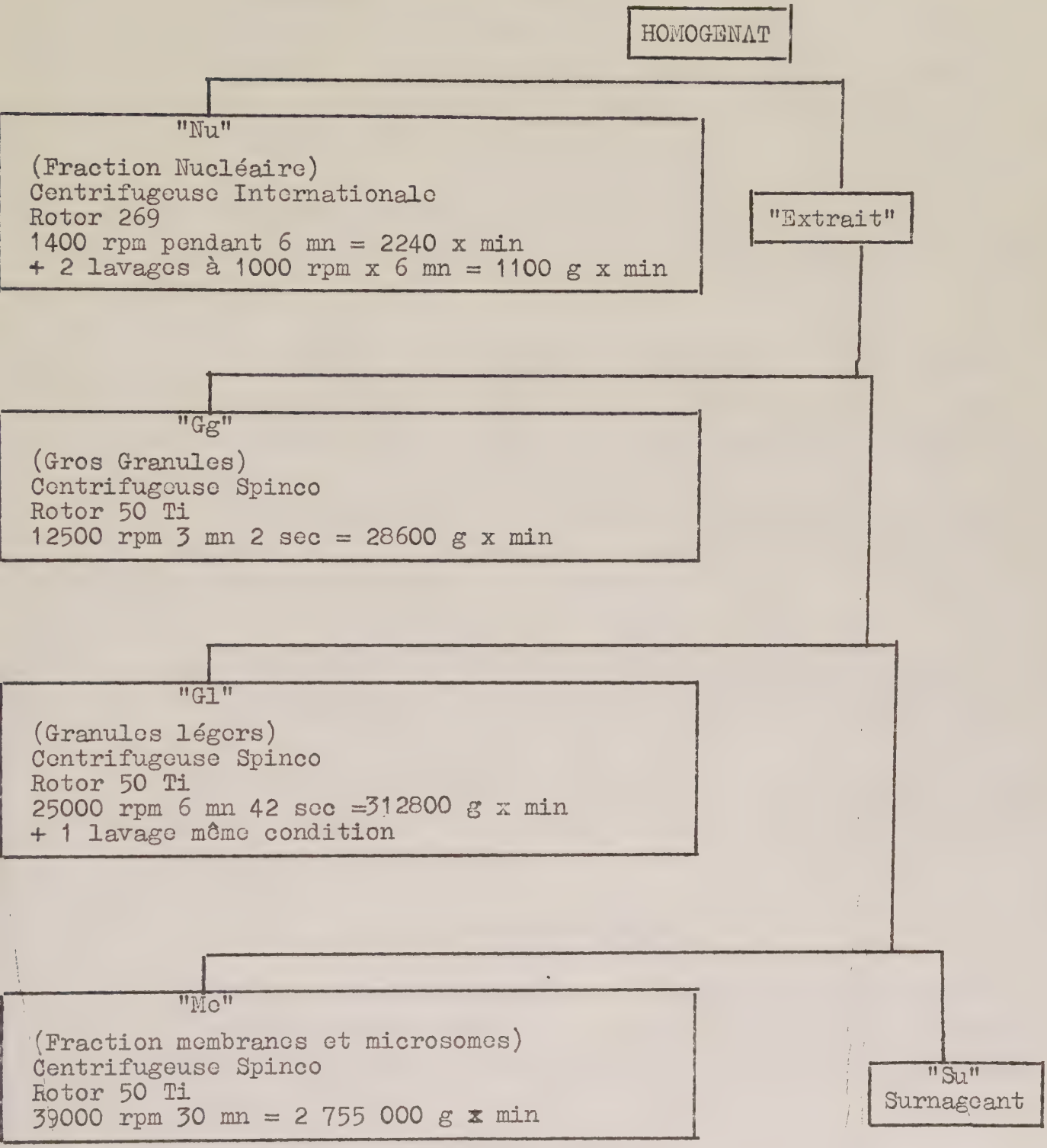
- Centrifugation en gradient de densité. Elle a lieu dans un milieu Sucrose à pH 7,4. La matériel est réparti de façon homogène dans le gradient qui est réalisé par un système mélangeur à deux réservoirs. La centrifugation dure 20 heures à 4°C (centrifugeuse Spinco L, Rotor SW 25, 20 000 rpm). Le contenu des tubes est recueilli par fraction à l'aide d'une pompe Technicon. La densité moyenne de chaque fraction est mesurée par référence à un gradient organique (éther de pétrole ortho dichlorobenzène) étalonné avec une gamme de solutions aqueuses de KBr de densités connues.

4°- Contrôle morphologique des fractions.

Quelques dizièmes de ml sont prélevés sur chaque fraction et filtrés, après une brève fixation (glutaraldéhyde 1,5 %, 30 min) sous pression d'azote sur membrane millipore (0,1 µ) selon la technique de BAUDHUIN et coll. (10). Ce procédé permet d'obtenir des pellicules réellement représentatives des fractions de sédimentation. Les pellicules sont ensuite incluses en Epon et examinées au microscope électronique (Elmiskop 1 A SIEMENS).

...

SCHAMA DE FRACTIONNEMENT DE LA MUQUEUSE FUNDIQUE DE RAT PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE EN MILIEU HOMOGENE.



...

B. EXPRESSION DES RESULTATS

La concentration des fractions subcellulaires en matériel est exprimée de façon relative en g de muqueuse/ml : une concentration de 1 g de muqueuse/ml pour une fraction donnée correspond à la concentration obtenue dans cette fraction lorsqu'un homogénat à 1 g de muqueuse/ml est soumis au fractionnement.

La concentration en protéine de chaque fraction en mg de protéine/ml est référée par rapport à la Sérum Albumine Bovine (SAB).

La validité des dosages biochimiques est jugée d'après la valeur des récupérations : valeur obtenue pour un pool de fraction/somme des valeurs fractionnelles (exprimé en %).

L'enrichissement d'une fraction donnée en enzymes, est exprimé pour la centrifugation différentielle en activité spécifique relative (ASR) par le rapport :

$$ASR = \frac{\text{Activité relative de la Fraction/activité de l'homogénat (\%}}{\text{Teneur en protéine de la fraction/teneur de l'homogénat (\%}}$$

Pour la centrifugation en gradient de densité on utilise de façon analogue la concentration spécifique relative (CSR) définie par le rapport :

$$CSR = \frac{(C/Ci)\ \text{enzyme}}{(C/Ci)\ \text{protéine}}$$

où C est l'activité (enzyme) ou la concentration (protéine) par ml après équilibration, et Ci l'activité ou la concentration par ml avant centrifugation pour un même intervalle de densité.

...

C.- DOSAGES ENZYMATIQUES (31)

Réactifs. Tous les substrats des réactions enzymatiques : β-2 glycérophosphate, p-Nitrophénylphosphate, ARN, Acide hyaluronique, Phénolphtaléine-β-D-Glucosiduronate, ADN, hémoglobine, Cytochrome C, 5'AMP, proviennent de chez SIGMA (SIGMA chemical Co, St Louis, Mi. USA).

Les tampons : Acétate, Tris, Glycocolle, l'acide Trichloracétique, le Triton x-100, proviennent de chez MERCK (E. MERCK AG, Darmstadt, R.F.A.).

Tous les autres produits sont "purs pour analyses".

1°- Phosphate acide.

Principe. L'enzyme hydrolyse un ester de phosphate organique. A la fin de la réaction, l'activité est donnée soit par la mesure du phosphore inorganique libéré, soit par la mesure de la partie organique libérée du substrat.

Mode opératoire.

Méthode I. Le milieu réactionnel (1 ml) contient :
- β-2-Glycérophosphate : 50 µM
- Tampon acétate pH 5 : 50 µM
- Enzyme : l'enzyme est apporté par 0,4 ml d'extrait ou de fraction correspondant à une concentration de 10 à 100 mg SAB/ml.

La réaction se déroule pendant un temps variant de 10 à 50 minutes à 37°C. Elle est arrêtée par 3 ml d'acide trichloracétique à 16 %. Après 24 heures à 0°C le précipité est filtré (filtre Whatman n° 42). Les phosphates libérés sont mesurés à partir de 2 ml du filtrat par la méthode de FISKE et SUBBAROW (36) comparativement à un "blanc" où l'enzyme est introduit qu'après précipitation par le TCA.

...

L'activité est exprimée en µMoles de phosphates libérées par ml d'enzyme (ou mg de protéine) par unité de temps, comparativement à une gamme de KH_2PO_4.

Méthode II. Le milieu réactionnel (1 ml) contient :
- Paranitrophénylphosphate : 3,2 µM
- Tampon Acétate pH 5 : 50 µM
- Enzyme : l'enzyme est apporté à 0,4 ml d'extrait ou de fraction correspondant à une concentration de 10 à 100 mg SAB/ml.

La réaction se déroule à 37°C entre 10 et 30 minutes. Elle est arrêtée par 3 ml de NaOH 0,13 N, et l'absorption du p-Nitrophénol est mesurée à 400 nm comparativement à un "blanc" où l'enzyme n'est introduit qu'après la soude.

L'activité est exprimée en µMoles de para-Nitrophénol libérée par ml d'enzyme (ou mg de protéine) par unité de temps, comparativement à une gamme de Paranitrophénol.

2°- β-Glucuronidase.

Principe. L'enzyme hydrolyse le phénolphtaléine-β-D-Glurosiduronate et l'absorption de l'Aglycone libéré est mesurée en pH alcalin à 555 nm.

Mode opératoire. Le milieu réactionnel (1,5 ml) contient :
- Phénolphtaléine -β-D-Glucosiduronate : 1 µM
- Tampon : acide acétique 300 mM_7 NaOH pH 4,5 : 100 µM
- Enzyme : l'enzyme est apporté par 0,5 ml d'extrait ou de fraction.

La réaction se déroule entre 10 et 80 minutes à 37°C. Elle est arrêtée par 3 ml de Na_2CO_3 M, et l'absorption de la phénolphtaléine libre est mesurée à 555nm comparativement à un "blanc" sans substrat. L'hydrolyse spontanée du substrat est mesurée de façon parallèle dans les mêmes conditions de molarité, de température et de pH.

...

Expression de l'activité. L'activité est exprimée en µM de phénolphtaléine libérée par ml d'enzyme (ou mg de protéine par minute, comparativement à une gamme de phénolphtaléine.

3°- Ribonucléase acide.

Principe. Des mononucléotides et des oligonucléotides sont libérés de l'acide robonucléique par une endopeptidase. Le substrat non dégradé est ensuite précipité par l'acide perchlorique contenant de l'Acétate d'Uranyl. Le coefficient d'absorption du surnageant qui contient les nucléotides de faible poids moléculaire est mesuré à 260 nm.

Mode opératoire. Le milieu réactionnel (2 ml) contient :

- ARN : 1,5 µg
- Tampon acétate , pH 5 : 100 µM
- Enzyme : l'enzyme est apporté par 0,5 ml d'extrait ou de fraction. La réaction se déroule de 10 à 80 minutes à 37°C. Elle est arrêtée par 2 ml d'un mélange à 0°C d'acide perchlorique à 10 % (W/V) et d'acétate d'uranyl à 0,25 % (N/V). Après 60 minutes à 0°C les tubes sont centrifugés (960 *g* x 30 min). L'absorption du surnageant est mesurée à 260 nm après une dilution au dizième comparativement à un "blanc" où l'enzyme n'a été introduit qu'après l'acide perchlorique.

Expression de l'activité. L'activité est exprimée en nombre de µMoles de nucléotides libérés par ml de fraction, ou par mg de SAB par minute, sur la base d'un coefficient d'extinction molaire de $8,5 \times 10^6$ par mononucléotide.

4°- Hyaluronidase.

Principe. L'acide hyaluronique est hydrolysé en oligosaccharides sous l'action de l'enzyme. Le résidu terminal réducteur N-Acéthylglucosamine est mesuré colorimétriquement.

...

Mode opératoire. Le milieu réactionnel (0,5 ml) contient :

- Acide hyaluronique : 0,50 mg
- Tampon formiate, pH 3,8 : 50 mM
- NaCl : 0,075 mM
- Enzyme : l'enzyme est apporté par 0,3 ml d'extrait ou de fraction.

La réaction se déroule entre 30 minutes et 8 heures à 37°C. Elle est arrêtée par 0,1 ml de tampon Borate 800 mM - pH 8,9. Les tubes sont ensuite mis trois minutes dans un bain marie à 100°C puis refroidis dans la glace fondante. Trois ml de p-diméthylaminobenzaldéhyde à 1 % sont alors ajoutés, et après 12 minutes à 37°C l'absorption est mesurée à 585 nm, comparativement à un "blanc" qui correspond au milieu d'incubation sans substrat. L'hydrolyse spontanée du substrat est mesurée de façon parallèle, dans les mêmes conditions de molarité, de température et de pH.

Expression de l'activité. L'activité est exprimée en nanomoles de produit libéré par ml de fraction (ou mg de protéine) par unité de temps, comparativement à une "gamme" d'N-Acéthylglucosamine.

5°- Latence.

Exception faite pour l'ARN et l'ADN, tous les dosages sont effectués sur du matériel "frais" (extrait ou fraction obtenus le jour même).

- Protéines : selon la méthode de LOWRY (60) en utilisant la sérum albumine bovine (SAB) comme référence.

- ARN et ADN : dosage différentiel à la diphénylamine et à l'orcinol.

- Cytochrome C oxydase : mesure à 550 nm de la vitesse d'oxydation du Cytochrome C réduit à 90 %.

- 5'Nucléotidase : hydrolyse du 5'AMP à pH 7,4 en présence de Mn^{++}, 0,1 mM.

...

RESULTATS

A.- CONDITIONS DE LINEARITE DES DOSAGES.

Ces conditions ont été établies sur l'homogénat total ou sur un matériel débarrassé de la fraction nucléaire et des protéines solubles (E-Su).

1°- Phosphatase acide.

La cinétique obtenue avec les deux substrats : β-2-Glycérophosphate et p-Nitrophényl-phosphate montre une excellente linéarité pendant au moins 60 minutes (Fig. 2 et 3).

Il existe une bonne proportionalité entre l'activité enzymatique et la concentration en enzyme dans les limites du dosage : temps 60 minutes, concentration 62,5 mg muqueuse/ml (Fig. 4).

2°- β-Glucuronidase.

La cinétique obtenue peut être considérée comme linéaire pendant les 40 premières minutes (fig. 5). Il existe une proportionalité entre l'activité enzymatique et la concentration en enzyme jusqu'à environ 40 mg de muqueuse par ml (Fig. 6).

3°- Ribonucléase.

La cinétique obtenue est linéaire pendant les 40 premières minutes (Fig. 7).

4°- Hyaluronidase.

Par la méthode que nous avons utilisée aucune activité hyaluronidasique significative n'a pu être mise en évidence.

...

B.- ETUDE DE LA LATENCE.

L'addition de détergent en concentration donnée provoque une augmentation de l'activité β-Glucuronidasique (Fig. 8) Cette augmentation, dans un rapport de 2, est obtenue d'emblée. La cinétique obtenue en présence de détergent est linéaire, comme la cinétique sans Triton, jusqu'à la 40è minute. Au delà l'infléchissement observé peut être mis sur le compte de l'épuisement du substrat (75 % d'hydrolyse à la 80è minute). La figure 9 montre l'action quantitative du détergent : quand pour une même concentration en Triton (0,1 % W/V) on fait varier, dans des conditions linéaires de dosage, la concentration en matériel dans la prise d'essai on observe un maximum d'activation (X 2,1) pour 38,4 mg de muqueuse/ml soit un rapport TRITON/Protéine de 0,240 mg/mg.

L'importance du rapport quantitatif TRITON/Protéine, dans le démasquage de l'activité phosphatasique acide (p NP) latente est précisée sur la figure 10 : l'activité en fonction de la concentration relative en TRITON montre un maximum pour une valeur de l'ordre de 0,3 mg/mg SAB. Pour cette valeur l'activité est multipliée par 2.

Par contraste avec les résultats précédents nous n'avons pas obtenu de latence significative avec la Ribonucléase acide.

C.- LOCALISATION SUBCELLULAIRE.

La figure II montre les profils de distribution intracellulaire des enzymes et des acides nucléiques marqueurs obtenus par centrifugation différentielle en milieu homogène. Les résultats exprimés en activité spécifique relative (ASR) en fonction de la teneur en protéine de chaque fraction font apparaître un enrichissement relatif de chaque marqueur au niveau de la fraction correspondante : ADN dans Nu (ASR = 3,1), Cyto-

...

chrome Oxydase dans Gg (ASR = 3,1) , 5'AMPase et ARN dans Me (ASR = 2,9 et 2,6). Par rapport à ces profils de référence, la phosphatase acide se distingue avec une répartition unimodale dont le maximum d'enrichissement se situe au niveau de G1 (ASR : 2,3). La récupération moyenne de 118 %.

C'est au niveau de cette même fraction G1, que les autres enzymes lysosomiaux étudiés montrent un enrichissement maximum (Fig. 12) : p-Nitrophényl phosphatase : ASR : 1, 73 ; β-Glucuronidase : ASR = 1,86 ; ARNase : ASR = 1,97.

Le tableau I donne les activités spécifiques des différents enzymes dans chaque fraction.

La figure 13 montre les résultats obtenus par équilibration isopycnique dans un gradient de densité de 23 % (d = 1,10 à 70 % (d = 1,32) de Sucrose à partir d'une fraction (E-Su) et d'une fraction G1.

Par rapport aux membranes plasmiques -(densité moyenne d'équilibre d = 1,12), au réticulum endoplasmique (densité d = 1,24) et aux mitochondries (densité d = 1,18), la phosphatase acide (p. Np) et la β-Glucuronidase montrent un maximum de concentration relative spécifique pour une zone de densité comprise entre 1,14 et 1,18. La ARNase acide n'a pas été dosée dans ces conditions.

DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être décrits reposent essentiellement sur l'utilisation des techniques de fractionnement subcellulaire. Nous ne discuterons pas ici de la validité de principe de ces techniques qui sont aujourd'hui largement utilisées. Leur application évoque néanmoins quelques causes d'erreur que nous nous sommes efforcés de minimiser.

Le postulat de la localisation unique associe biunivoquement un enzyme donné à une structure subcellulaire déterminée ; cependant on ne peut pas rigoureusement écarter la possibilité pour certains enzymes d'avoir une localisation multiple (1, 54, 24), deux enzymes très voisins voire identiques peuvent appartenir à plusieurs structures subcellulaires différentes dont les caractères fonctionnels sont associés. C'est le cas notamment des enzymes lysosomiaux qui peuvent être retrouvés au niveau du réticulum et au niveau du Golgi, étape de la synthèse subcellulaire du lysosome (45, 68).

L'utilisation de ce postulat n'a pas ailleurs de signification que dans la mesure où les conditions expérimentales respectent deux principes fondamentaux : le procédé de fractionnement utilisé doit conserver l'intégrité des organites subcellulaires et ne pas créer d'artéfact de structure, les enzymes étudiés doivent faire l'objet d'un dosage sélectif par le choix notamment de pH appropriés et de substrats spécifiques.

Dans la pratique ces deux principes sont difficiles à respecter. Il existe un endomagement initial des organites soit au niveau de l'homogénéisation, soit au niveau de la centrifugation. La qualité de l'homogénéisation dépend à la fois de la fragilité spécifique de l'organite concerné dans le tissu étudié et de l'architecture même de ce tissu. La présence d'un tissu de soutient important dans la muqueuse gastrique rend difficile l'homogénéisation qui est nécessairement plus drasti-

que que dans le cas d'un parenchyme (foie, pancreas). Au niveau de la centrifugation l'endomagement peut être mis sur le compte des manipulations successives (récupération des culots) d'un contact prolongé avec le milieu très osmotique (gradient de Sucrose), de la pression hydrostatique. A cet égard la qualité globale d'un fractionnement est appréciée sur la proportion d'enzymes solubles retrouvés dans le surnageant, et sur l'examen des microphotographies des pellicules de filtration.

On ne peut éviter non plus la création d'un certain nombre d'artéfacts au cours du processus de fractionnement. Certains sont la règle : formation de microsomes à partir du réticulum, d'autres, occasionnels, sont le fait de l'entrainement conjoint de deux organites de type différent ou de l'adsorption des enzymes solubilisés à la surface des organites. La contamination est particulièrement à craindre dans le cas du fractionnement de la muqueuse gastrique, matériel composite, contenant entre autre du mucus. D'autant plus importante que le matériel subcellulaire est moins purifié, elle est considérablement réduite dans le cas de fractionnement d'homogénats débarrassés de la fraction nucléaire et du surnageant, ou de sous-fractions de fractions enrichies.

Le choix des constituants biochimiques marqueurs (acides nucléiques, enzymes) est guidé par un ensemble de considérations (bonne activité spécifique, localisation précise, existence de substrats spécifiques) qui ne retient que les plus performants. L'ADN, l'ARN, la Cytochrome oxydase sont à cet égard des marqueurs de choix d'utilisation courante. La spécificité et la fiabilité de la 5'AMPase, dans la muqueuse fundique du rat, a été vérifiée dans des travaux antérieurs du laboratoire (81). Plus de quarante enzymes lysosomiaux ont été mis en évidence dans les lysosomes de divers tissus (8). Les enzymes que nous avons retenus en ce qui nous concerne ont été abondament décrits dans le lysosome hépatique (24, 77). La β-Glycérophosphatase acide est historiquement la première hydrolase acide explorée. Sa locali-

...

sation est strictement lysosomale dans le foie de rat (24). Par contre le p-nitrophénylphosphate est hydrolysé aussi bien par la glucose-6-phosphatase microsomale que par la p-nitrophényl phosphatase lysosomale (64). Cependant dans notre matériel l'activité G.6 pasique est très faible sinon nulle (LEWIN, communication personnelle). Une p-NPase K^+ stimulable a par ailleurs été décrite dans les microsomes du tissu cérébral de rat (1). La β-Glucuronidase est, dans le foie de rat, essentiellement localisée au niveau des lysosomes, mais il existe une activité non négligeable de cet enzyme au niveau du réticulum endoplasmique (24, 35, 89). La ARNase acide a été trouvée étroitement associée à la phosphatase acide dans le fractionnement subcellulaire du foie de rat (24). La hyaluronidase est un enzyme lysosomal confirmé (5, 86).

Les techniques de fractionnement subcellulaire ont été mises au point et développées sur le foie de rat ou le pancréas tissus homogènes.

La transposition de ces techniques à la muqueuse gastrique soulève un certain nombre de problèmes spécifiques de ce matériel : hétérogénéité du tissu au niveau de l'organe, hétérogénéité cellulaire au niveau du tissu. La muqueuse fundique qui, macroscopiquement se distingue nettement de l'antre et du rumen dans l'estomac de rat, doit être séparée, par raclage, du tissu sous-jacent. Ce recueil qui doit être représentatif et reproductible doit être soigneusement quantifié. Au niveau du fundus il existe au moins trois types cellulaires différents également représentés, pour ne parler que des types dominants. L'application d'une méthodologie tendant à fondre ces 3 unités entre elles peut bien entendu porter à critique. Le fractionnement subcellulaire mis au point sur la muqueuse gastrique a été étalonné par rapport au même fractionnement réalisé sur le foie de rat. Par rapport à cette référence les résultats obtenus se sont avérés tout à fait interprétables : au niveau cellulaire, les cellules principales sont représentées par le pepsinogène tandis que la majorité des mitochondries revient aux cellules

...

pariétales. Le mucus n'a pas été analysé, c'est un facteur de contamination important que nous avons déjà mentionné. Au niveau subcellulaire les distributions unimodales observées sur le mélange d'organites homologues issus de différents types cellulaires témoignent qu'il n'existe pas entre eux de différence particulière de taille ou de densité. Bien évidemment un un fractionnement réalisé dans de telles conditions est incapable de donner le moindre renseignement sur la spécificité cellulaire des lysosomes mis en évidence ; à cet égard une étude morphologique complémentaire est indispensable.

La discussion des résultats obtenus tient compte des réserves qui viennent d'être faites. Nous n'avons pas eu dans ce travail la prétention de faire une étude enzymatique approfondie des hydrolases choisies. Cependant les dosages ont été réalisés dans des conditions de spécificité et de linéarité qui nous ont parues satisfaisantes pour une mesure correcte de leur activité.

Trois enzymes lysosomiaux ont été nettement mis en évidence dans la muqueuse fundique du rat : la phosphatase acide (β-Glycérophosphatase et p Npase), la β-Glucuronidase et la ribonucléase acide, tous trois spécifiquement plus actifs au niveau de la fraction G1. Le tableau II compare les activités spécifiques de ces enzymes avec les valeurs de la littérature, trouvées pour le foie (24, 77) et pour le rein (78). Les activités sont en général plus faibles pour l'estomac que pour les deux autres tissus. Cependant la teneur en ARNase de la muqueuse gastrique est assez proche de celle du foie. L'activité β-Glycérophosphatasique est près de 3 fois moins grande que dans le rein et environ 5 fois moins grande que dans le foie. Ce résultat suggère, compte tenu en outre de l'hétérogénéité de structure déjà évoquée, que les lysosomes de la muqueuse gastrique sont proportionnellement moins nombreux que dans le foie. Nous n'avons pas, par contre, trouvé d'activité hyaluronidasique signifiça-

...

tive. Ce résultat négatif ne nous semble cependant pas définitivement acquis dans la mesure ou nous n'avons pas, pour cet enzyme procédé à un dosage comparatif sur le foie où elle a été décrite de façon formelle (5).

Les phosphatases acides et la β-Glucuronidase présentent une latence indiscutable : l'activité est progressivement démasquée lorsqu'on introduit dans le milieu réactionnel des quantités croissantes de Triton x 100. Ces résultats sont en faveur de la localisation de ces enzymes à l'intérieur d'une structure granulaire séparée du cytoplasme par une membrane lipidoprotidique sensible au détergent.

En ce qui concerne la ARNase acide nous n'avons pas obtenu de latence significative même dans les conditions optimales (rapport Triton/protéine = 0,375 ⟶ ≃ 0,3), qui correspondent pour les autres enzymes étudiés à une activation de plus de deux fois. Ce dernier résultat est en contradiction avec ce qui est obtenu sur le foie où la latence de la ribonucléase peut être étroitement superposée avec celle de la phosphatase acide quels que soient les moyens utilisés (Triton, congélation, décongélation, sonication, température) pour lyser les lysosomes (24). Cependant l'augmentation de l'activité, quand les granules sont lysés par le triton, reste relativement faible par rapport aux taux d'activation obtenus sur le foie et le rein (24, 77, 78).

Les résultats du fractionnement en centrifugation différentielle sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus sur des tissus homogènes (24, 78). On note l'importance relative de la fraction nucléaire due à la contribution dans cette fraction des cellules non cassées et des grands fragments de membrane plasmique qui sédimentent avec les noyaux. Elle reflète en partie la qualité de l'homogénéisation. L'examen de la quantité d'enzyme retrouvé dans le surnageant et qui traduit l'importance de la solubilisation fait apparaître pour la phosphatase acide un

...

endomagement d'environ 30 %. Ce résultat suggère que l'homogénéisation casse d'emblée un pourcentage équivalent de lysosome. Les pourcentages de récupération obtenus, en général satisfaisants, témoignent de la bonne cohérence des dosages. Malgré le recouvrement attendu des profils de distribution enzymatique, la discrimination des organites de référence est nette. Le pouvoir de résolution du système de fractionnement est limité, compte tenu d'une part des contaminations qui ont été évoquées, et d'autre part du fait que la partition est faite sur la base de la taille moyenne des organites : deux populations voisines d'organites sont d'autant mieux différenciées que celles-ci sont plus homogènes. Cette situation, particulièrement défavorable dans le cas des lysosomes qui sont généralement très polymorphes, ne peut être améliorée que dans une certaine limite par la multiplication du nombre des fractions.

Dans notre expérience l'enrichissement obtenu pour la phosphatase acide est comparativement plus faible que celui obtenu dans le foie pour ce même enzyme (24, 77). Ce fait tient en partie à l'importance de la fraction G1 qui rep résente en moyenne 10 % des protéines totales. La comparaison des profils de distribution de la phosphatase acide, de la β-Glucuronidase et de la Ribonucléase acide montre une distribution unimodale avec un maximum d'enrichissement au niveau de la même fraction G1. Toutefois les profils ne sont que grossièrement superposables compte tenu des causes d'erreurs déjà évoquées.

Les résultats de la centrifugation en gradient de densité sont aussi en bon accord avec les résultats obtenus par d'autres au niveau du foie (11, 12). La phosphatase acide (β-Glucérophosphatase) et la β-Glucuronidase sont nettement séparées de la Cytochrome oxydase. Cependant ici encore les profils de distribution ne sont pas tout à fait superposables.

...

Contrairement à la β-Glucuronidase qui est distribuée de façon unimodale le long du gradient de densité, on observe pour la phosphatase acide une distribution franchement bimodale dont le second mode correspond à la densité d'équilibre du réticulum endoplasmique. Ce fait doit être interprété comme une contamination. Notons que la distribution de la β-Glucuronidase a été obtenue à partir d'une fraction purifiée.

L'ensemble de ces résultats montrent donc la mise en évidence d'hydrolases acides dont l'activité, pour la plupart à l'état latent, est distribuée au cours du fractionnement subcellulaire selon des profils associés. La présence de lysosomes dans la muqueuse fundique du rat est donc indiscutable. La localisation cellulaire de ces organites va faire l'objet de l'étude morphologique suivante.

oOo

...

II. ETUDE MORPHOLOGIQUE

Le rôle physiologique des lysosomes implique que ces organites existent sous des aspects variés dans la cellule. Il n'en faudrait pour preuve que les différentes terminologies qu'ils reçoivent : lysosomes primaires, lysosomes secondaires, autolysosomes, cytoségrésomes, etc. (26). En fait tous les composants granulaires cellulaires qui ont, à un moment de leur existence, un contenu en relation avec les hydrolases acides, peuvent être considérés comme des lysosomes.

La localisation cytochimique des hydrolases acides est indispensable pour l'identification morphologique des lysosomes in situ. La mise en évidence de la phosphatase acide par la méthode de GOMORI (40) au sulfure de plomb est la plus employée car le produit de la réaction est facilement identifiable aussi bien en microscopie optique qu'électronique. Cette réaction, essentiellement étudiée au niveau du foie, a été reprise par BARKA et ANDERSON (7) utilisant le β-Glycérophosphate comme substrat en présence de nitrate de plomb.

Il existe d'autres méthodes basées sur la mise en évidence des produits de réaction de la thiocétase-estérase (62) et de l'arylsulfatase (38) en microscopie électronique. D'autres hydrolases acides comme la β-glucuronidase (41) et la β-N-Acétyl-amino-déoxyglucosidase (42) n'ont été révélées qu'en microscopie optique.

...

MATERIEL ET METHODES

1°- Histochimie optique.

Un rat femelle, de race WISTAR CF (géniteur CNRS) d'un poids d'environ 200 g, non soumis au jeûne préalable, est assomé. L'estomac est prélevé, ouvert le long de la grande courbure et lavé avec du sérum physiologique. Sur le fundus deux fines bandelettes (1 x 3 mm) sont découpées avec des ciseaux et sont enrobées dans un milieu d'inclusion aqueux (TISSUPEK Décimu, France et congelées à -20°C. De petits fragments de foie sont également prélevés et congelés de la même façon.

Des coupes épaisses de 10 µ pour le fundus et de 12 µ pour le foie sont effectuées avec un cryostat. Ces coupes sont recueillies sur lame de verre et sont fixées 4 heures à 4°C dans le glutaraldéhyde 4 % tamponée par le Cacodylate 0,2 M, pH 7

L'incubation a lieu à 25°C avec la β-Glycérophosphate 2 mM comme substrat (SIGMA - Chemical Co, St Louis, Mi, USA), dans un tampon acétate 40 mM pH 5 et du Nitrate de plomb 0,135 M. Le milieu d'incubation témoin ne contient pas de substrat.

Les temps d'incubation varient pour le foie de 10 à 40 minutes et de 30 minutes à 2 heures pour le fundus. La réaction est arrêtée par un rinçage de 1 minute dans un tampon acétate 0,2 M pH 5 à 4°C, puis un autre rinçage de 1 minute dans l'acide acétique à 2 ‰. La révélation de la réaction se fait par une immersion brève dans le sulfure d'ammonium à 2 % et l'on pratique une coloration de fond par le Carmin Aluné.

...

2°- Cytochimie Electronique.

Des fragments d'environ 1 mm^3 de muqueuse fundique et de foie sont prélevés et fixés comme précédemment. Après 24 heures de rinçage dans le tampon Cacodylate 0,2 M pH 7,4 , les fragments sont redécoupés avec une lame de rasoir sous loupe binoculaire en aussi petits morceaux que possible.

Le milieu d'incubation, la température, les temps d'incubation et l'arrêt de la réaction sont les mêmes que précédemment. Le milieu d'incubation témoin ne contient pas de substrat Les fragments sont ensuite rincés 24 heures dans le tampon cacodylate 0,2 M , pH 7,4 , puis post-fixés une heure dans l'acide osmique à 1 %, deshydratés dans l'alcool et inclus en Epon.

Les coupes ultrafines sont effectuées sur un ultramicrotome Reichert. Elles sont colorées par l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb. Elles sont examinées avec un microscope électronique ELMISKOP IA SIEMENS.

RESULTATS

Pour le foie on obtient une réaction positive dès la dixième minute. Le maximum d'activité se situe entre 20 et 30 minutes, cette augmentation d'activité s'observe de façon parallèle en microscopie optique (Photos n° 1 et 2) et électronique. Pour des temps plus longs, il se produit en plus de la réaction un précipité de plomb essentiellement localisé au niveau du noyau dû à une affinité trinctoriale non spécifique.

...

Les lysosomes sont essentiellement situés au voisinage des canalicules biliaires comme cela a été décrit (67), (photos n° 3 et 4).

Pour le fundus, la réaction ne devient positive que vers 30 minutes et son maximum d'intensité se situe entre 1 heure et 2 heures. Au delà on observe, comme pour le foie un précipité de plomb se localisant également au niveau des noyaux mais aussi dans les canalicules des cellules pariétales.

L'histochimie optique montre la présence des lysosomes tout le long du tube glandulaire, dans les 3 types cellulaires. La densité de cellules contenant des lysosomes est plus grande au niveau du collet du tube glandulaire. Les lysosomes sont plus nombreux dans les cellules pariétales que dans les deux autres types cellulaires (photos n° 5 et 6).

En cytochimie électronique, on confirme l'existence d'organites cellulaires à membrane unique donnant une réadtion phosphatase acide positive. Ces organites peuvent donc être considérés comme des lysosomes. Ils sont présents dans les trois types cellulaires de la muqueuse (photos n° 7, 8, 9 et 10) et dans le fibrocyte de la sous-muqueuse (photo n° 12). On retrouve dans les cellules de la muqueuse fundique un grand polymorphisme des lysosomes, en rapport avec leur activité physiologique et leur contenu (photos n° 13, 14, 15 et 16).

...

DISCUSSION

Les lysosomes ont surtout été étudiés au niveau du foie car c'est l'étude biochimique de fractions subcellulaires de foie de rat qui permit leur découverte par DE DUVE et ses collaborateurs (4, 24).

La mise en évidence de nombreux lysosomes dans les hépatocytes du rat confirme la validité entre nos mains de la réaction de la phosphatase acide transposée à l'étude de la muqueuse fundique du rat.

Le temps de la réaction nécessaire pour mettre en évidence les lysosomes est très différent pour le fundus et pour le foie. Nous avons constaté que pour avoir une réaction positive au niveau des lysosomes des cellules du fundus, il fallait un temps minimum trois fois supérieur à celui nécessaire pour obtenir une réaction analogue dans le foie. Les temps d'incubation que nous avons utilisés sont du même ordre de grandeur que ceux utilisés pour le fundus par d'autres auteurs (94). Cette différence de temps d'incubation peut s'expliquer par un contenu enzymatique lysosomial quantitativement différent, hypothèse soulevée par HAYASHI (43), mais peut être aussi par un temps de pénétration plus long des produits de la réaction dans le fundus par rapport au foie.

Dans la muqueuse gastrique les lysosomes ont surtout été reconnus dans les cellules pariétales sous le nom de "dense bodies" (58, 44, 54). Ces coprs sont limités par une membrane unique, ils sont plus ou moins chargés d'un matériel opaque aux électrons. Au niveau de ces "dense bodies", nous avons observé une réaction positive pour la phosphatase acide, confirmant d'autres travaux (93).

...

Nous n'avons pas retrouvé, dans la littérature, de travaux mettant en évidence cytochimiquement en microscopie électronique des lysosomes dans les cellules principales et les cellules à mucus de la muqueuse gastrique. Cependant, leur localisation, à ces deux types cellulaires, a déjà été démontrée par des méthodes histochimiques en microscopie optique (72). Nous avons trouvé l'existence de lysosomes au niveau des cellules à catécholamines (type IV de FORSSMANN) alors que RUBIN ne met en évidence aucune activité phosphatasique dans les différents types de cellules endocrines de la muqueuse de l'estomac humain (75).

CONCLUSION

L'étude de la réaction de la phosphatase acide confirme l'existence des lysosomes dans la muqueuse fundique du rat. Elle permet de préciser leur localisation dans la muqueuse au niveau des cellules à mucus, des cellules principales et des cellules pariétales où ils sont particulièrement nombreux.

Des lysosomes existent aussi dans certaines cellules endocrines de la muqueuse fundique.

oOo

CONCLUSIONS

La présence de lysosomes dans la muqueuse fundique du rat a été démontrée selon des critères de définition biochimique, par la mise en évidence de trois hydrolases acides associée en un même profil de répartition au cours du fractionnement subcellulaire (réalisé aussi bien par centrifugation différentielle en milieu homogène que par équilibration isopycnique en gradient de densité). Il s'agit de la Phosphatase acide (EC 3.1.3.2.), de la β-Glucuronidase (EC 3.2.1.31.) et de la Ribonucléase acide (EC 2.7.7.16.). Pour deux de ces enzymes (la phosphatase acide et la β-Glucuronidase) l'existence d'une activité enzymatique latente est révélée par l'accroissement de l'activité sous l'action d'un détergent : le TRITON X-100.

L'étude en microscopie optique et électronique, basée sur la révélation de l'activité d'un de ces enzymes (la phosphatase acide), précise la localisation et la morphologie de ces lysosomes. Ils ne diffèrent pas dans leur aspect et de ceux décrits dans d'autres tissus. Ils sont surtout présents dans les cellules pariétales, mais on les observe aussi dans les cellules principales, les cellules muqueuses et même dans certains types de cellules endocrines de la muqueuse fundique.

L'utilisation corrélative des techniques biochimiques et cytologiques apparait être le fondement d'une approche correcte de l'étude du lysosome au cours des processus de surcharge ou de destruction cellulaire.

TABLEAU I

	Mu	Gg	Gl	Me	Su	Homogénat	Récupération (%)
β-Glycéropho.ase	9,5 10,6 %	13,9 15,6 %	30,4 34,1 %	18,8 21,1 %	16,5 18,5 %	10,3 100 %	126
p.N Pase	29,9 16,9 %	17,1 9,7 %	54 30,6 %	49,2 27,9 %	26 14,7 %	32,6 100 %	83
β-Gluc.	6,1 21,5 %	7,1 25,1 %	11,5 40,6 %	3 10,6 %	0,6 2,1 %	8,1 100 %	
+ ARNase	17,06	45,16 19,0 %	72,48 30,5 %	53,17 22,4 %	49,4 20,8 %	32,9 100 %	101

ACTIVITE SPECIFIQUE : mμM de produit libéré par minute et par mg de proteine dans différentes fractions.

TABLEAU II

ACTIVITES SPECIFIQUES DES ENZYMES ETUDIES DANS DES HOMOGENATS DE DIFFERENTS TISSUS.

	β-Glycéroph.	p.Nitroph.ph	β-Glucur.	ARNase
FOIE*				
DE DUVE et Coll (24)	96,8	-	12,5	43,2
REIN				
SHIBKO et coll (78)	52,8	52	16,4	7,9
ESTOMAC	18,7	32,6	8,09	32,9

ACTIVITE SPECIFIQUE EXPRIMEE EN mμM de produit libéré par minute et par mg de proteine

* Les résultats donnés par DE DUVE et coll. sont exprimés par mg d'Azote. Un facteur de correction de 16 (teneur moyenne d'azote des protéines) a été appliqué pour rendre les résultats comparables.

FORMATION ET ACTION DU LYSOSOME DANS LA CELLULE

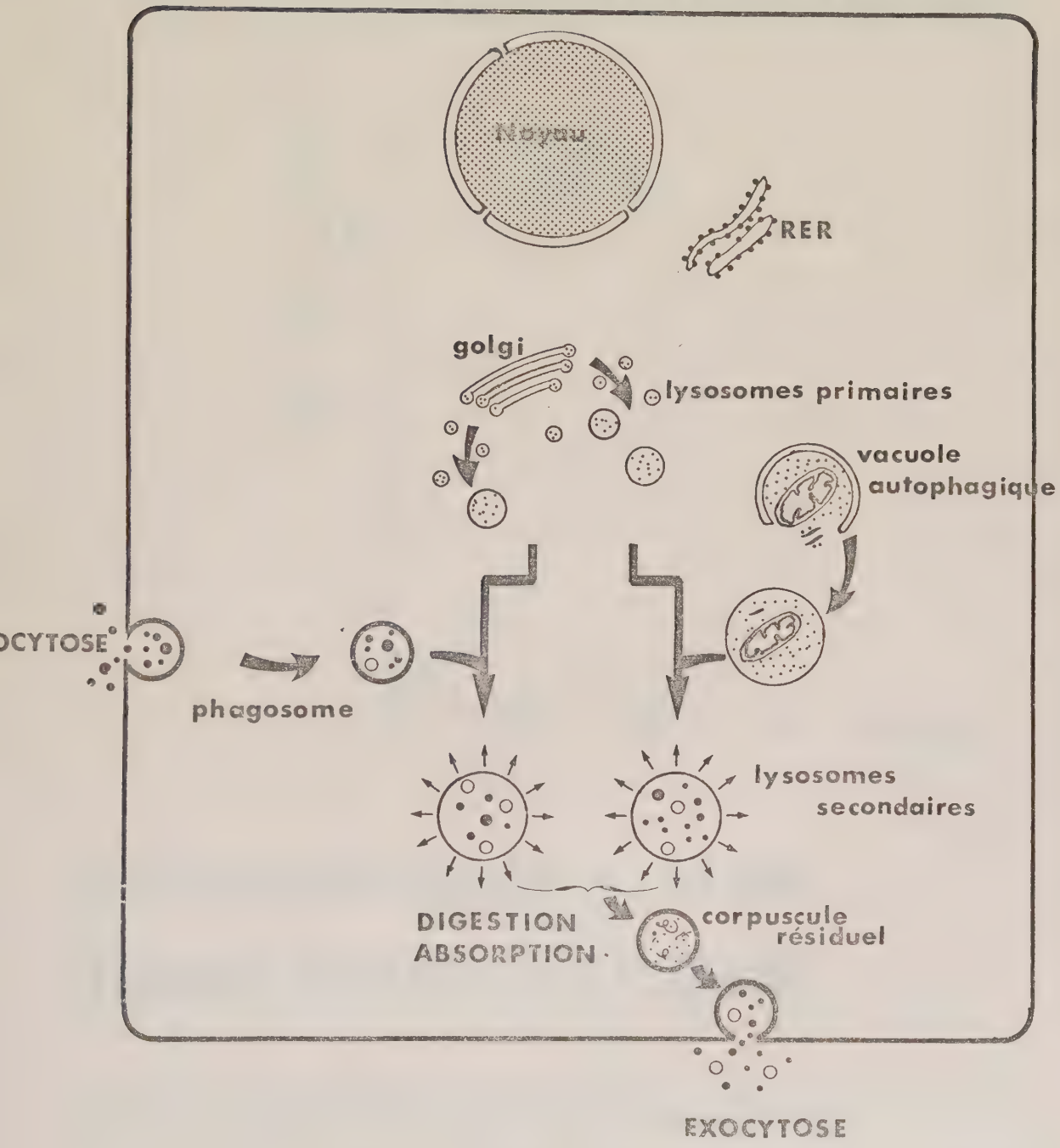
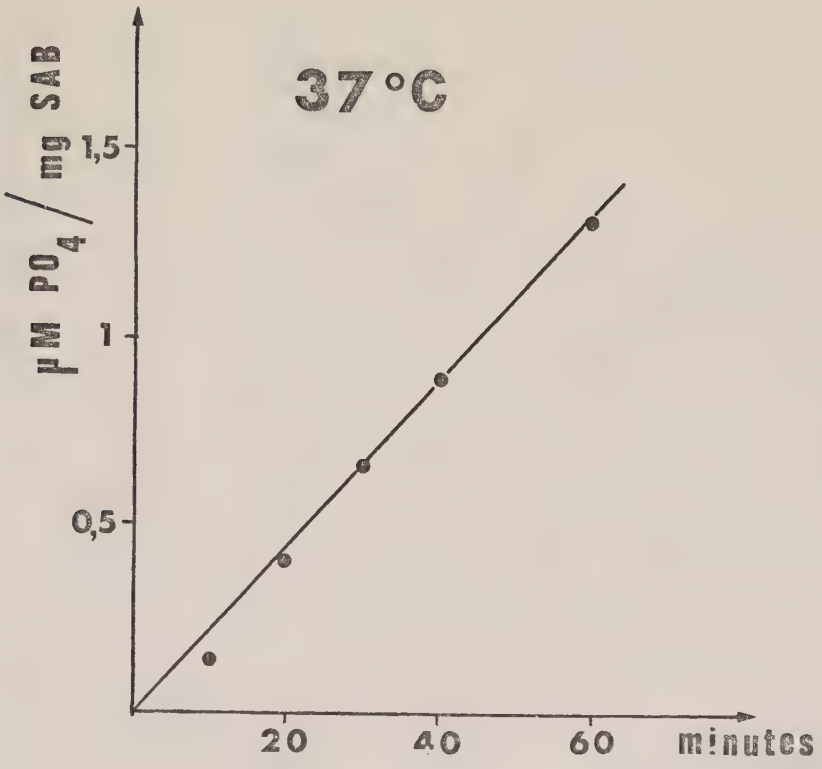


FIGURE 1

PHOSPHATASE ACIDE
β-2-Glycérophosphate

Activité en fonction du temps



[β Glycérophosphate] = 50 mM

[Tampon Acétate pH 5] = 50 mM

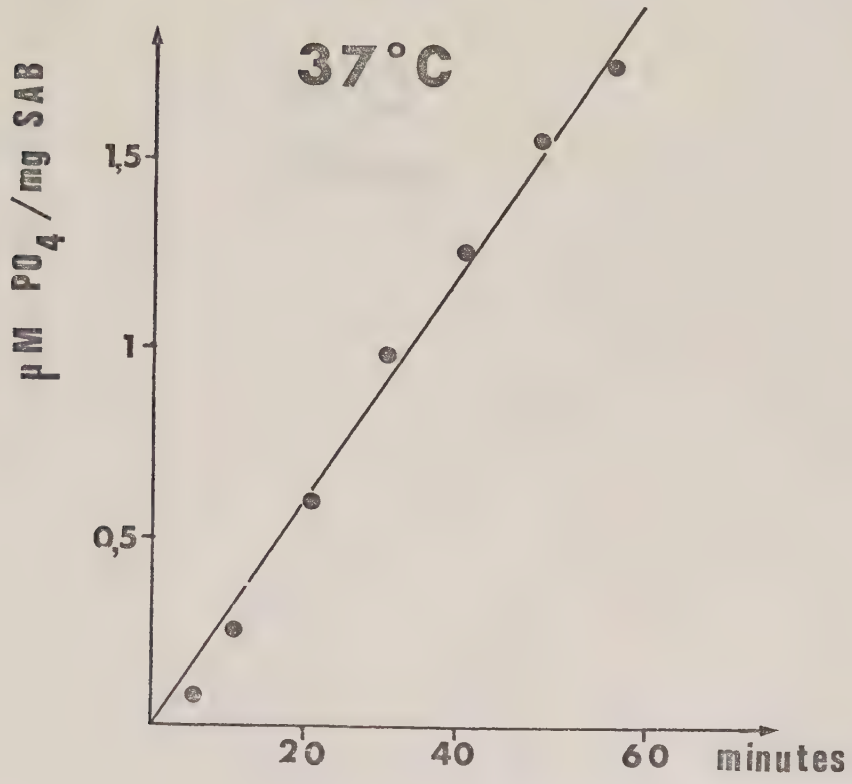
Enzyme apporté par 0,4 ml de matériel [E-Su]
correspondant à 23 mg de muqueuse / ml (1,07 mg SAB / ml)

FIGURE 2

PHOSPHATASE ACIDE

p Nitrophénylphosphate

Activité en fonction du temps



[p Nitrophénylphosphate] = 3,2 mM

[Tampon Acétate pH 5] = 50 mM

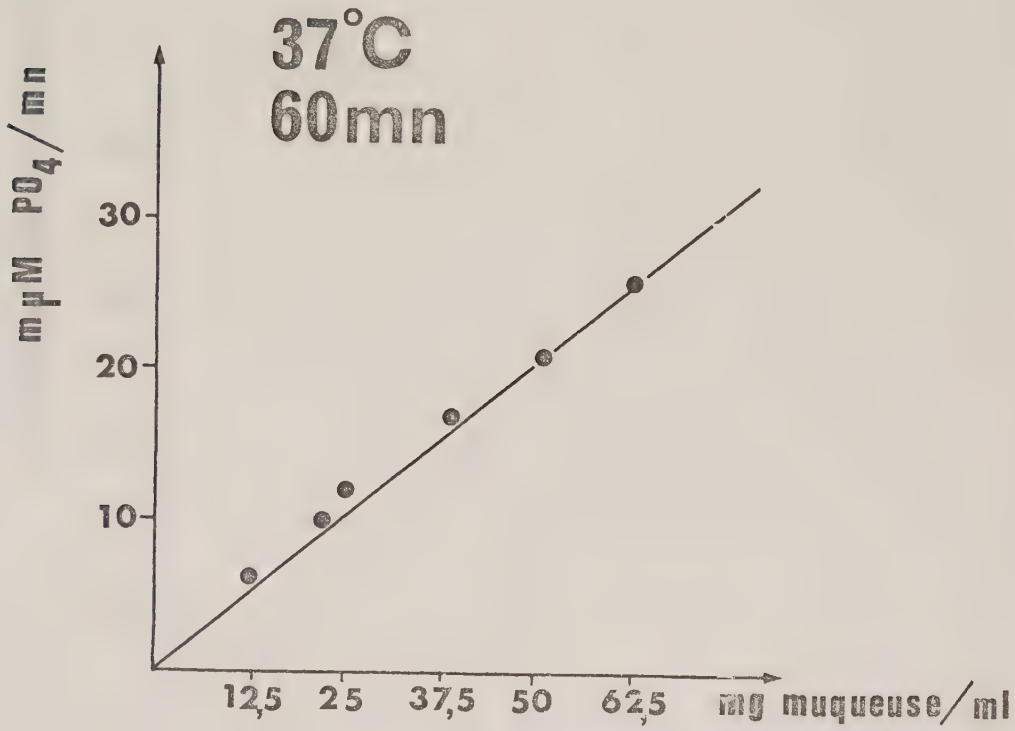
Enzyme apporté par 0,4 ml de matériel [E-Su]

correspondant à 12 mg de muqueuse/ml (0,59 mg SAB/ml)

FIGURE 3

PHOSPHATASE ACIDE
β-2-Glycérophosphate

Activité en fonction de la concentration en enzyme



[β Glycérophosphate] = 50 mM

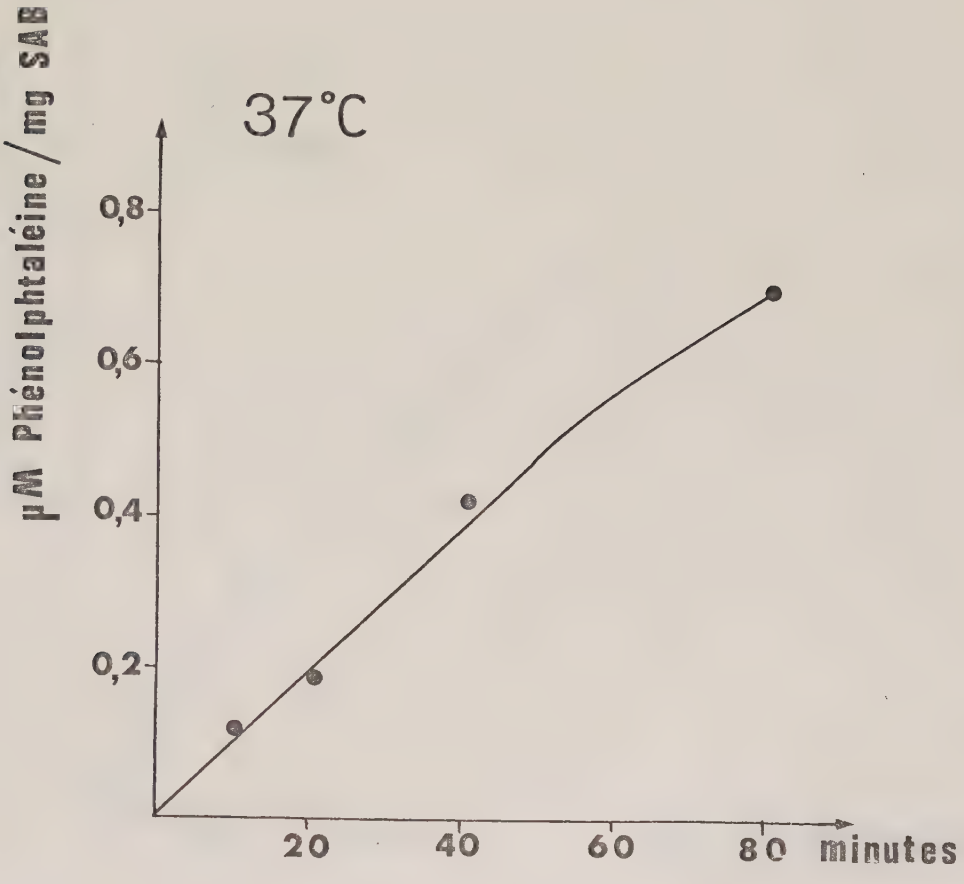
[Tampon Acétate pH 5] = 50 mM

Enzyme apporté par 0,4 ml de matériel (Homogénat)

FIGURE 4

β-GLUCURONIDASE

Activite en fonction du temps



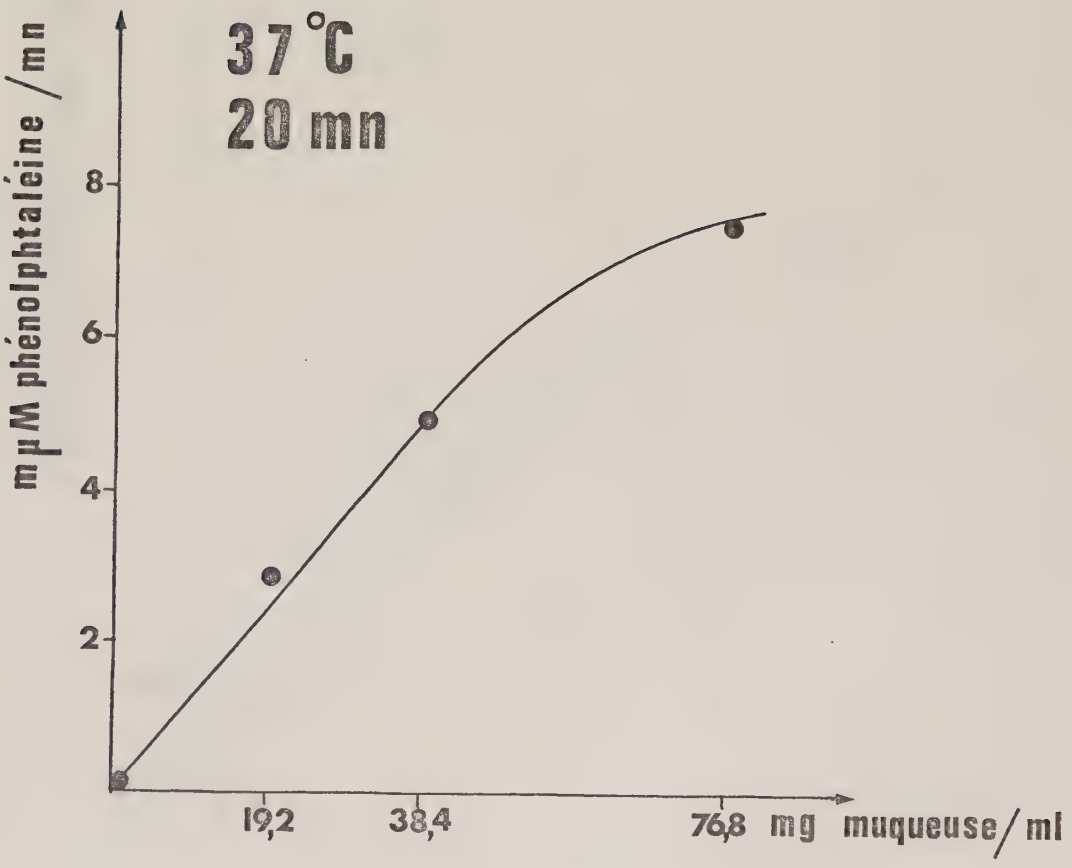
[Phénolphtaléine-β-D-Glucosiduronate] = 1 mM
[Tampon Acide Acétique, NaOH pH 4,5] = 100 mM

Enzyme apporté par 0,5 ml de matériel [E-Su]
correspondant à 38,4 mg de muqueuse/ml (2,1 mg de SAB / ml)

FIGURE 5

β- GLUCURONIDASE

Activité en fonction de la concentration en enzyme



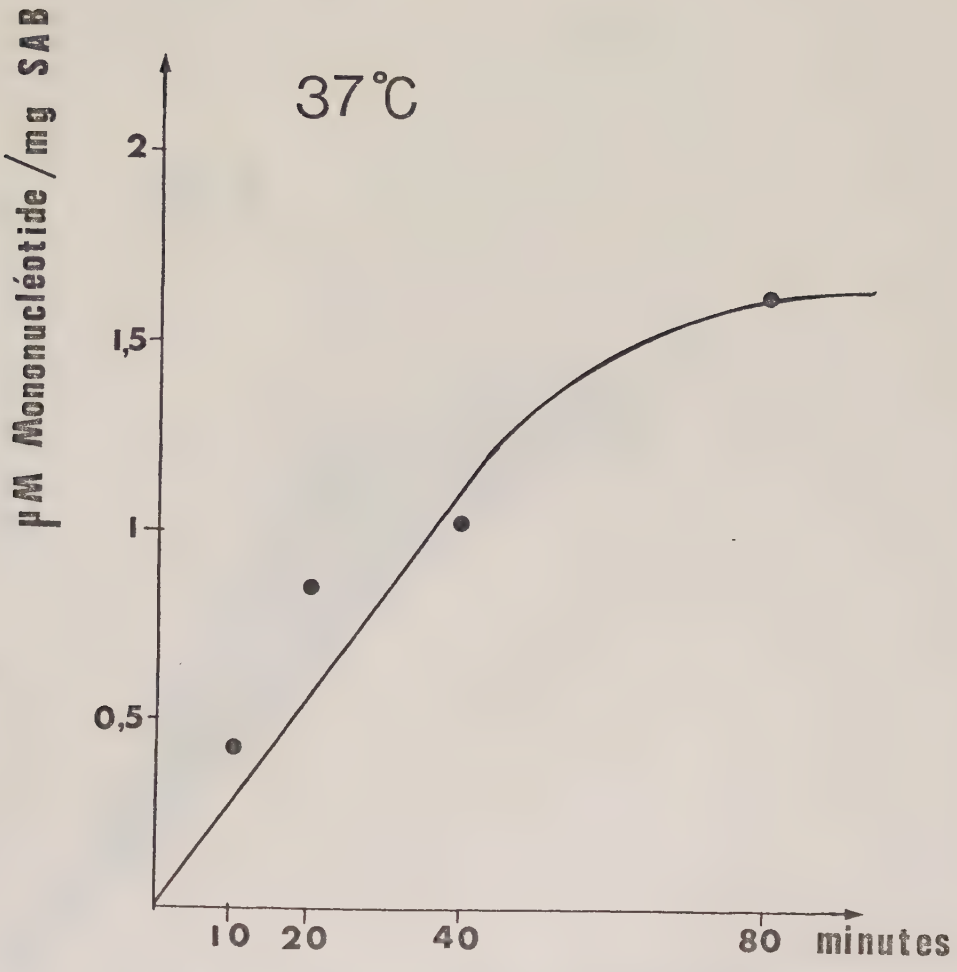
[Phénolphtaléine-β-D-Glucosiduronate] = 1 mM
[Tampon Acide Acétique NaOH pH 4,5] = 100 mM

Enzyme apporté par 0,5 ml de matériel [E-Su]

FIGURE 6

RIBONUCLEASE ACIDE

Activité en fonction du temps



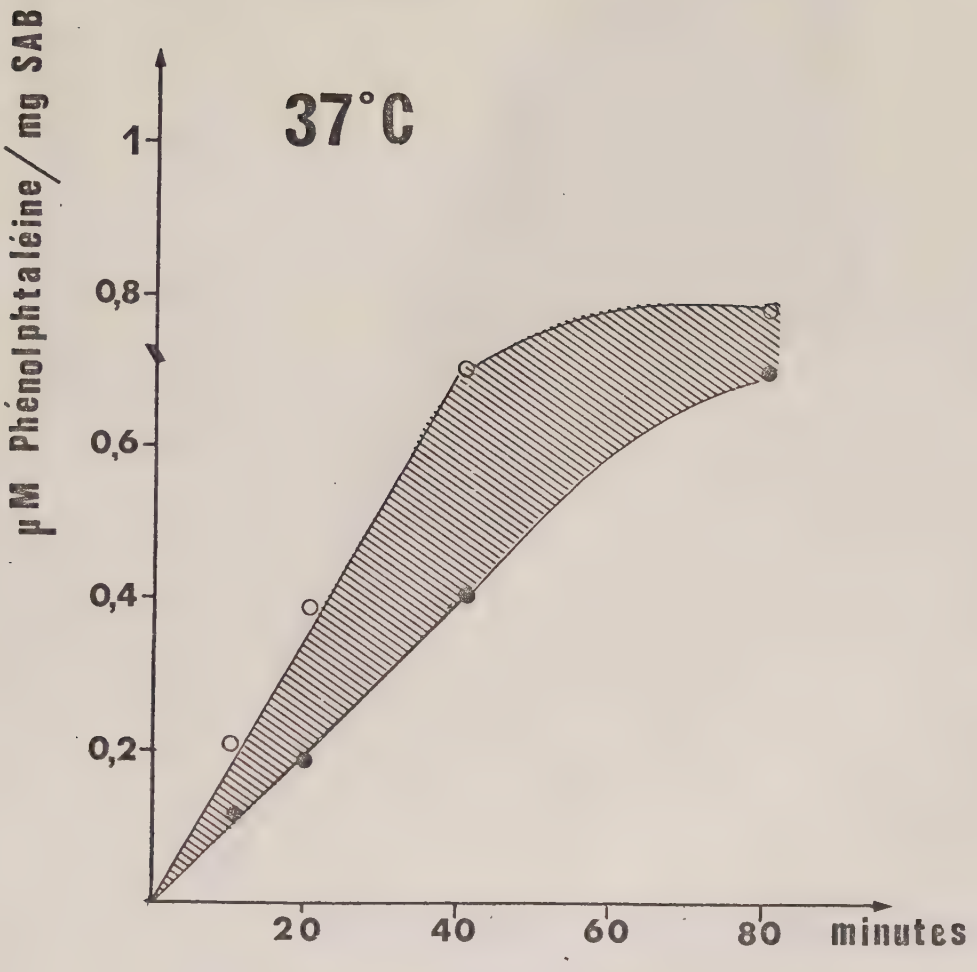
[ARN] = 1,5 mg/ml
[Tampon Acétate pH 5] = 100 mM

Enzyme apporté par 0,5ml de matériel [E-Su]
correspondant à 48 mg de muqueuse/ml (2,7 mg SAB/ml)

FIGURE 7

β-GLUCURONIDASE

Effet du TRITON X 100



[Phénolphtaléine-β-D-Glucosiduronate] = 1 mM

[Tampon Acide Acétique, NaOH pH 4,5] = 100 mM

Enzyme apporté par 0,5 ml de matériel [E-Su] correspondant à 38,4 mg de muqueuse/ml (2,1 mg SAB/ml)

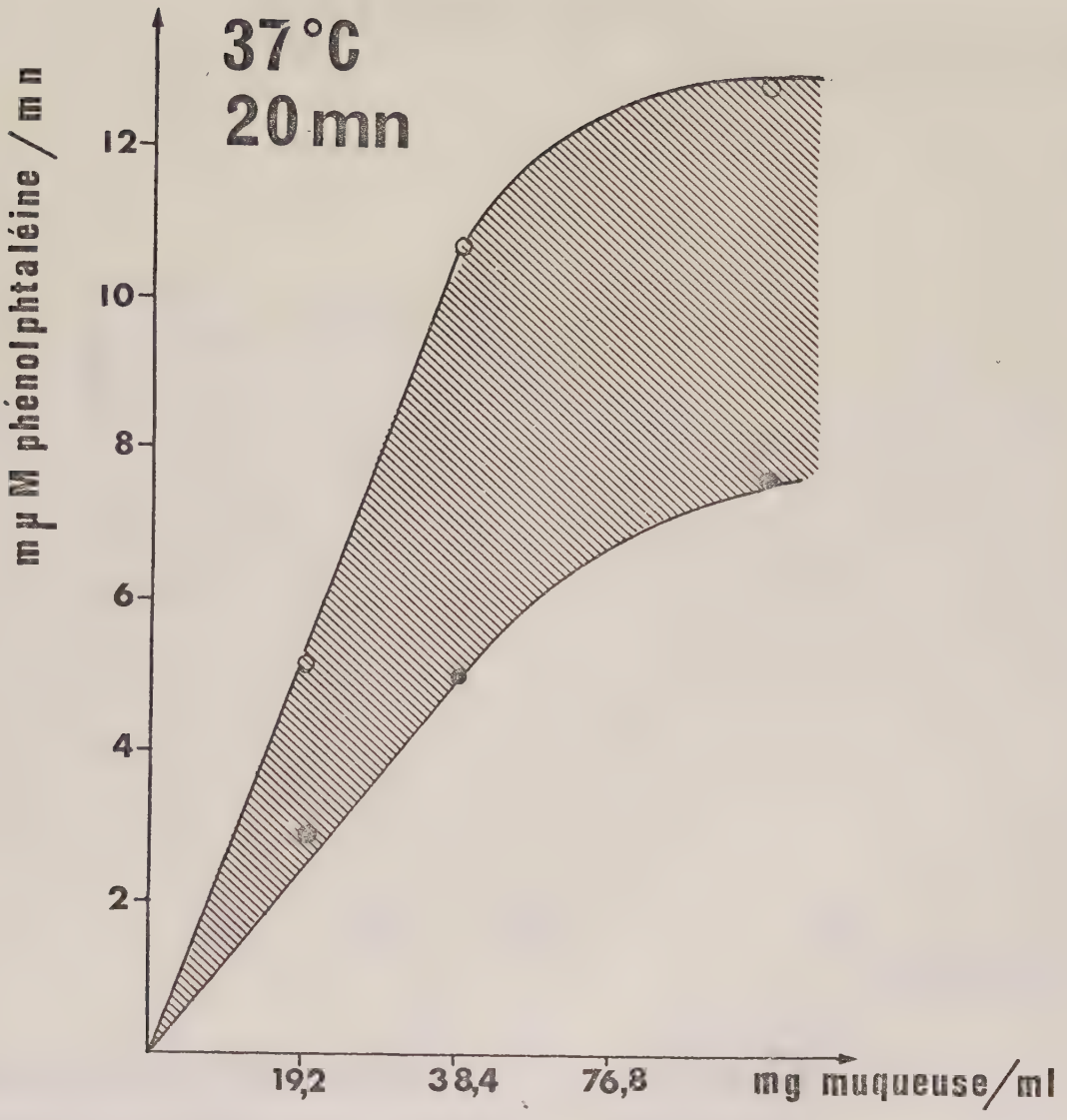
●—● Sans TRITON

○—○ TRITON X 100 0,1% W/V

FIGURE 8

β-GLUCURONIDASE

Effet du TRITON X100



[Phénolphtaléine-β-D-Glucosiduronate] = 1mM
[Tampon acide acétique, NaOH] pH 4,5 = 100mM

Enzyme apporté par 0,5 ml de matériel [E-Su]

●——● Sans TRITON

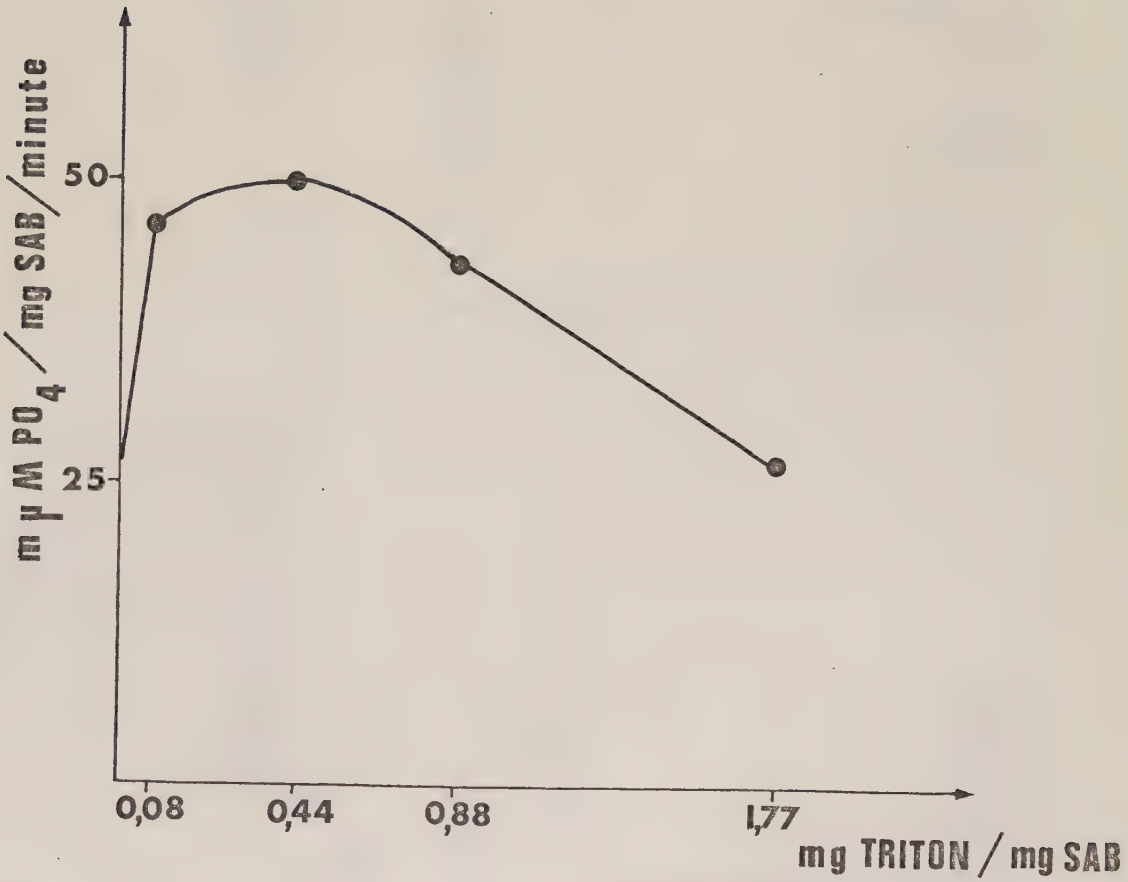
○——○ TRITON X 100 0,1% w/v

FIGURE 9

PHOSPHATASE ACIDE

(p NP)

Activité en fonction du rapport TRITON X100 / mg protéine



[p. nitrophenylphosphate] = 3,2 mM
[Tampon Acetate pH 5] = 50 mM

Enzyme apporté par 0,4 ml de matériel [E-Su] correspondant à 15 mg de muqueuse ml (0,67 mg SAB ml)

FIGURE 10

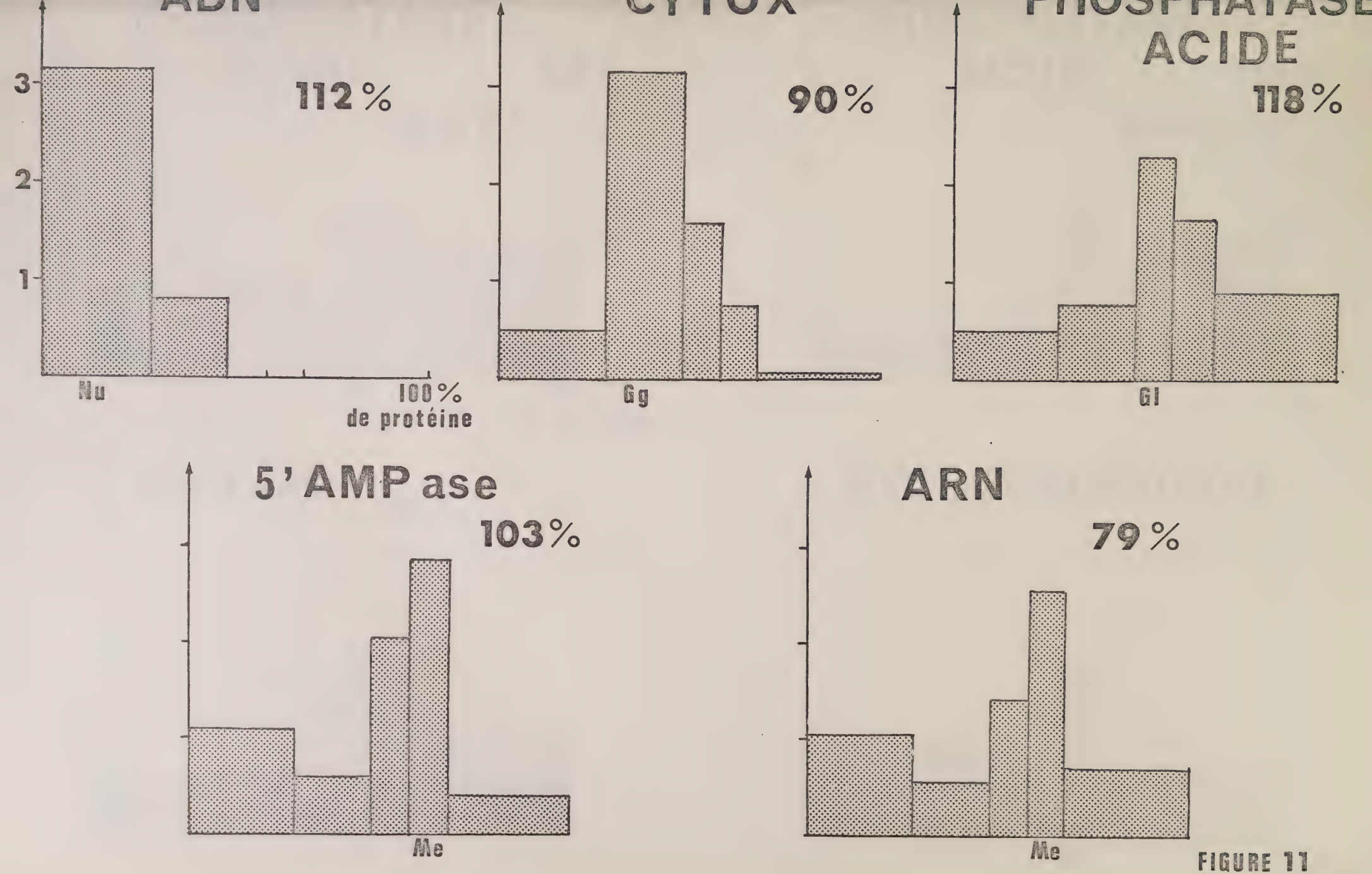
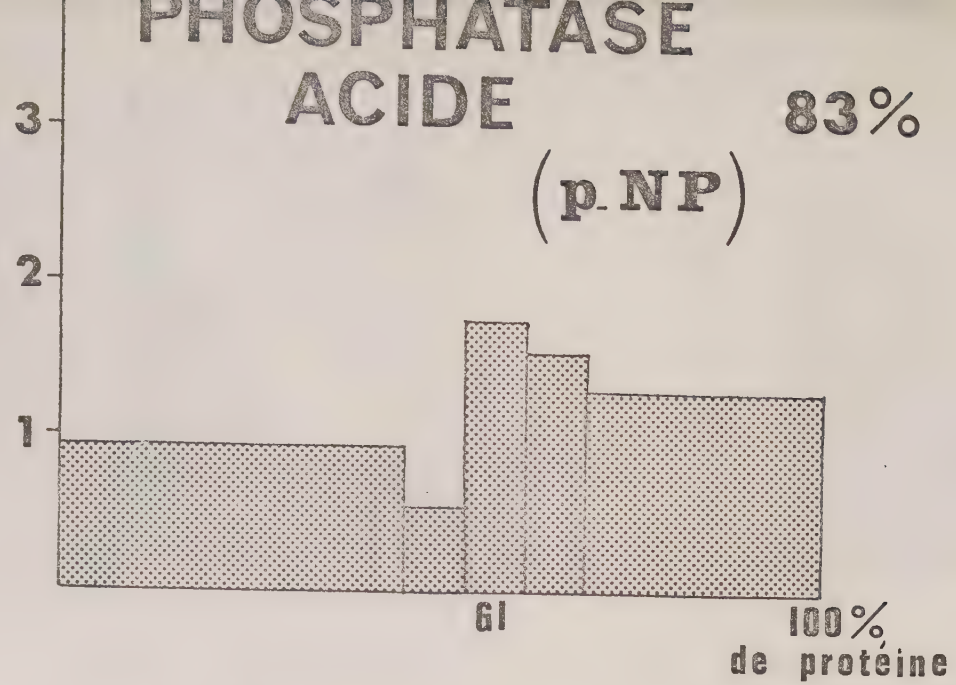
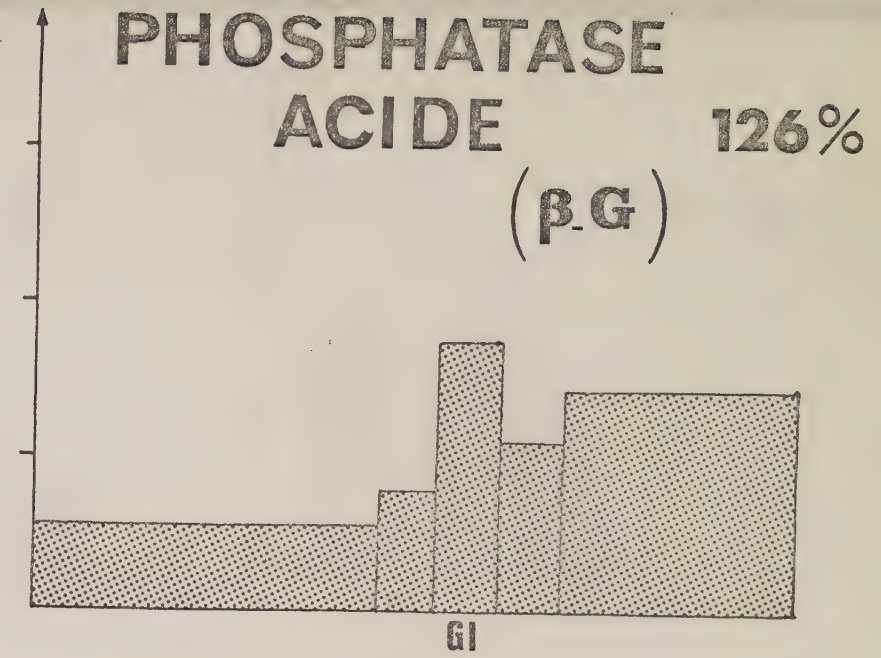
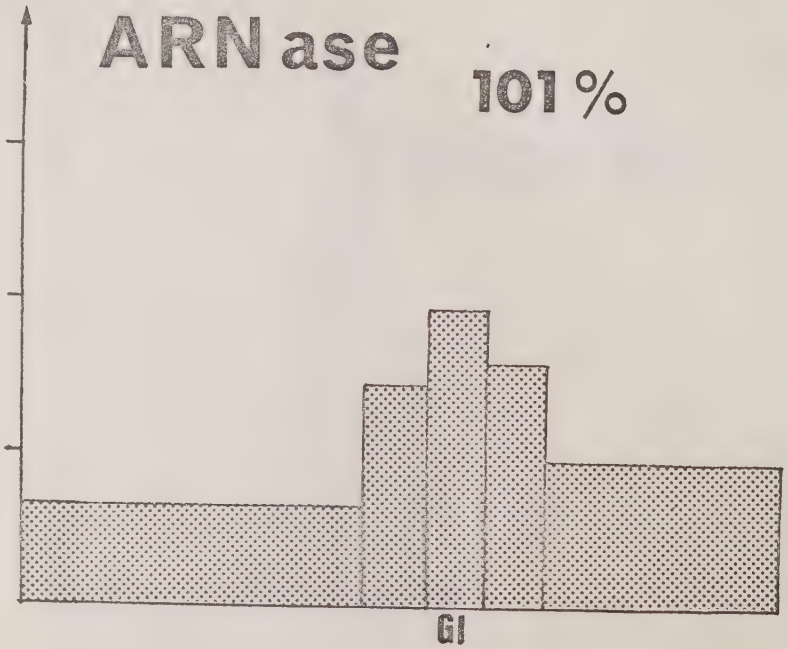

ADN
112 %
3
2
1
Nu
100 %
de protéine
CYTOX
90 %
Gg
PHOSPHATASE
ACIDE
118 %
Gl
5' AMP ase
103 %
Me
ARN
79 %
Me

FIGURE 11


PHOSPHATASE
ACIDE
83%
(p-NP)
3
2
1
GI
100%
de protéine


PHOSPHATASE
ACIDE
126%
(β-G)
GI


ARN ase
101%
GI

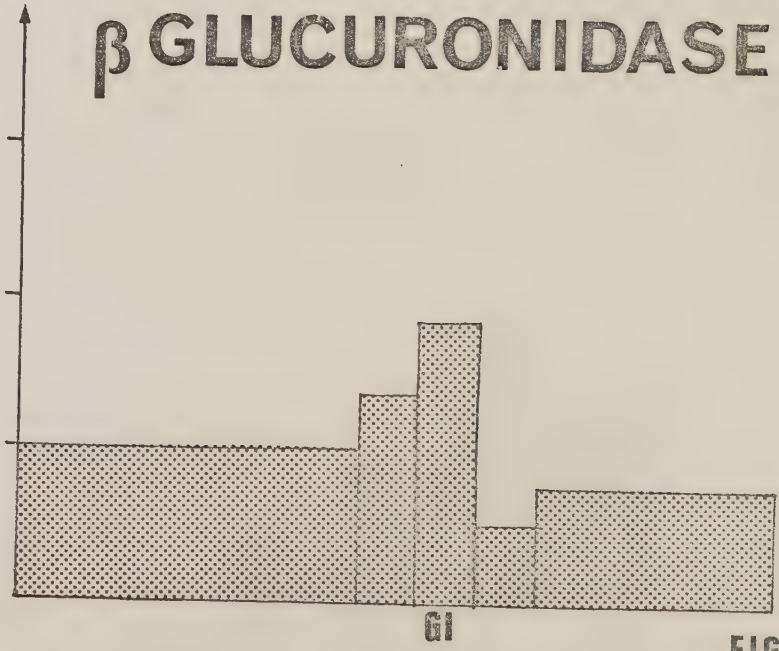
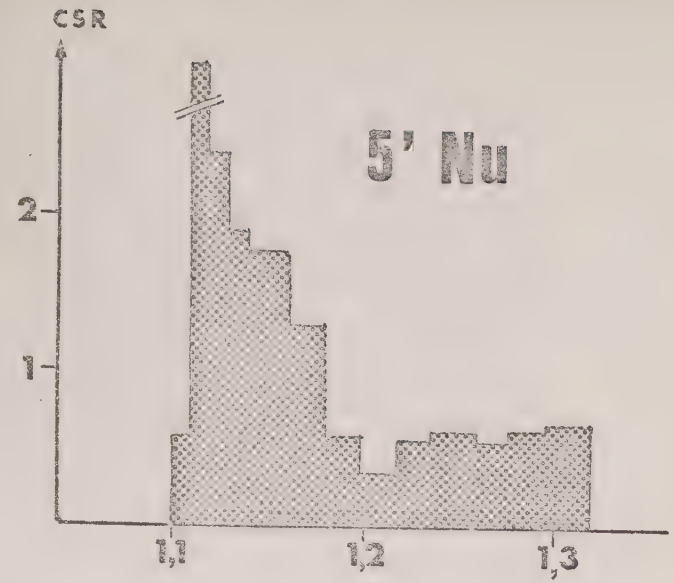
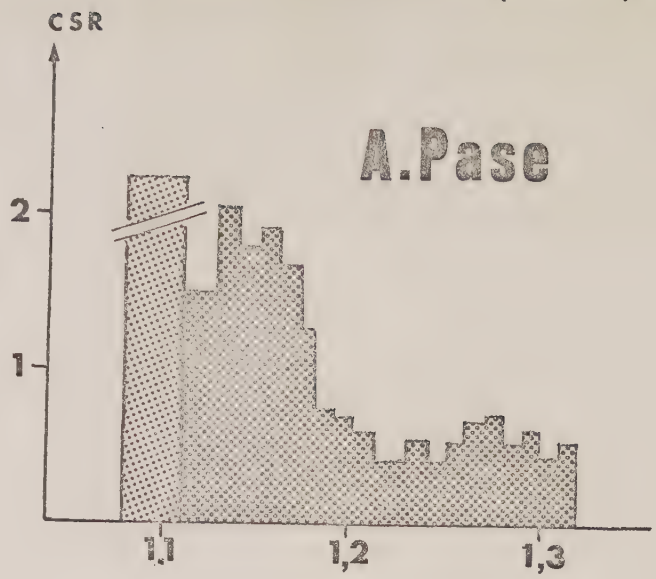
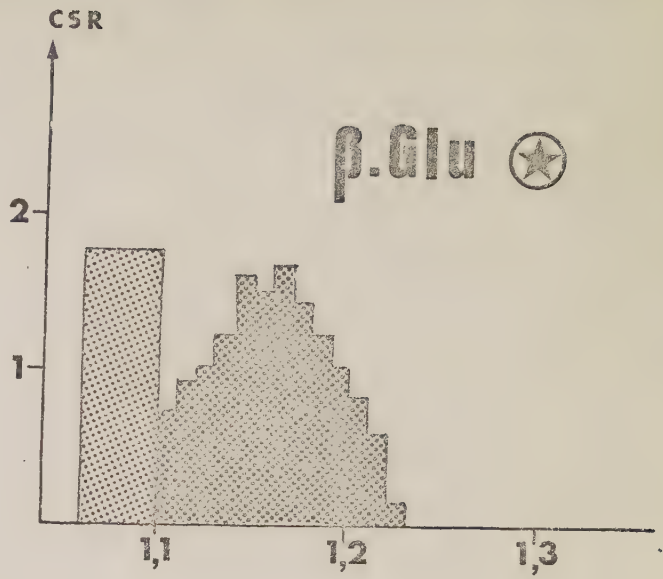
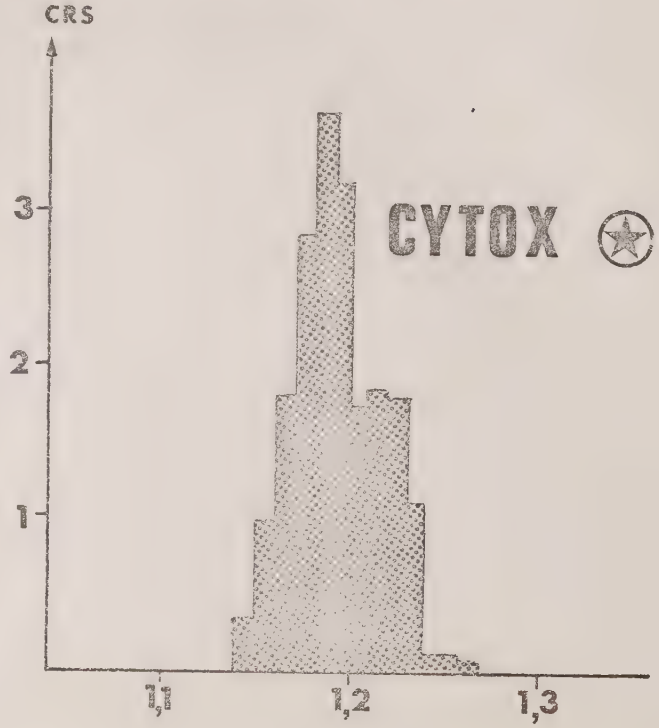

β GLUCURONIDASE
GI

FIGURE 12


CSR
5' Nu
2
1
1,1
1,2
1,3


CSR
A.Pase
2
1
1,1
1,2
1,3


CSR
β.Glu
2
1
1,1
1,2
1,3


CRS
CYTOX
3
2
1
1,1
1,2
1,3

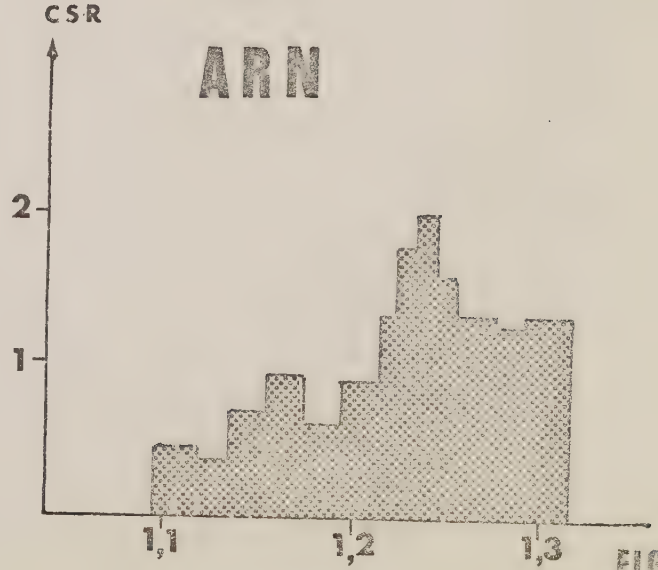

CSR
ARN
2
1
1,1
1,2
1,3

FIGURE 13

Photo n° 1 : FOIE : Témoin sans substrat. Incubation 30 minutes, pH5, 25°C. ×300

Photo n° 2 : FOIE : Réaction positive. Incubation 30 minutes, ß-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C. ×300

1

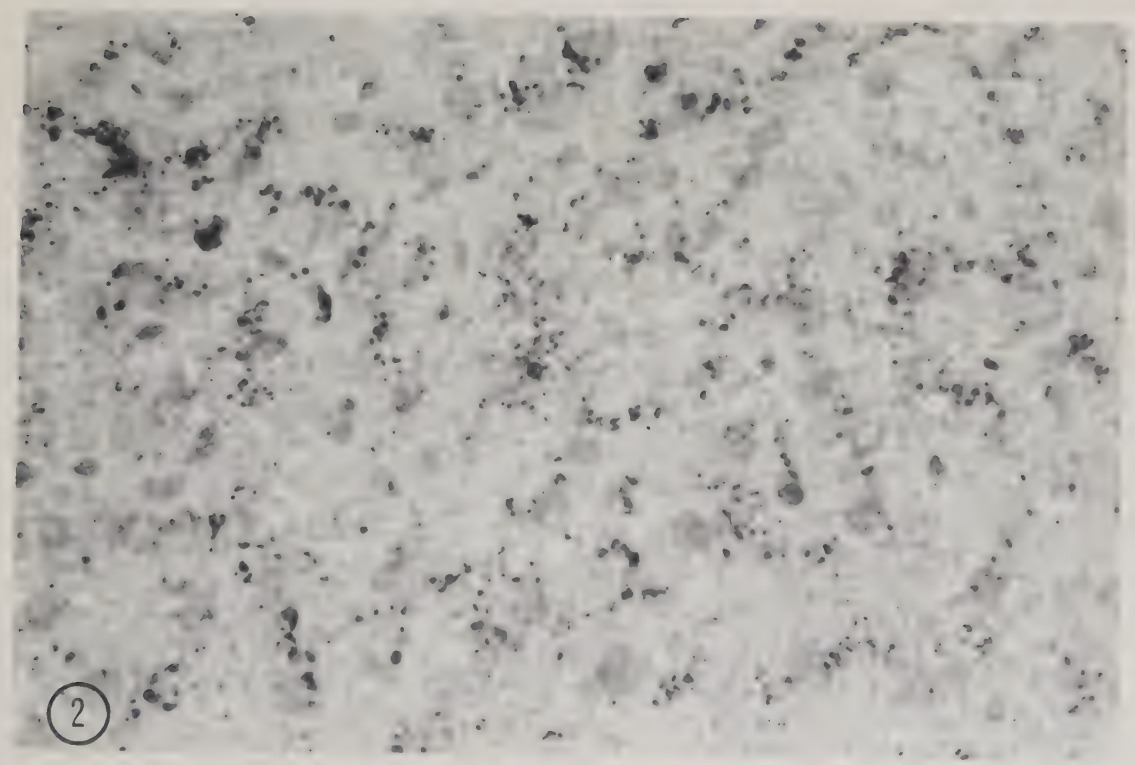

2

Photo n° 3 : FOIE : Témoin sans substrat. Incubation 30 minutes, pH5, 25°C.

Deux hépatocytes adjacents sont séparés par leur membrane plasmique (↺), formant en un point le canalicule biliaire (Cb). Près de lui existent plusieurs corps denses péribiliaires à membrane unique (↓). N = Noyau, Mi = Mitochondrie. ×23.500

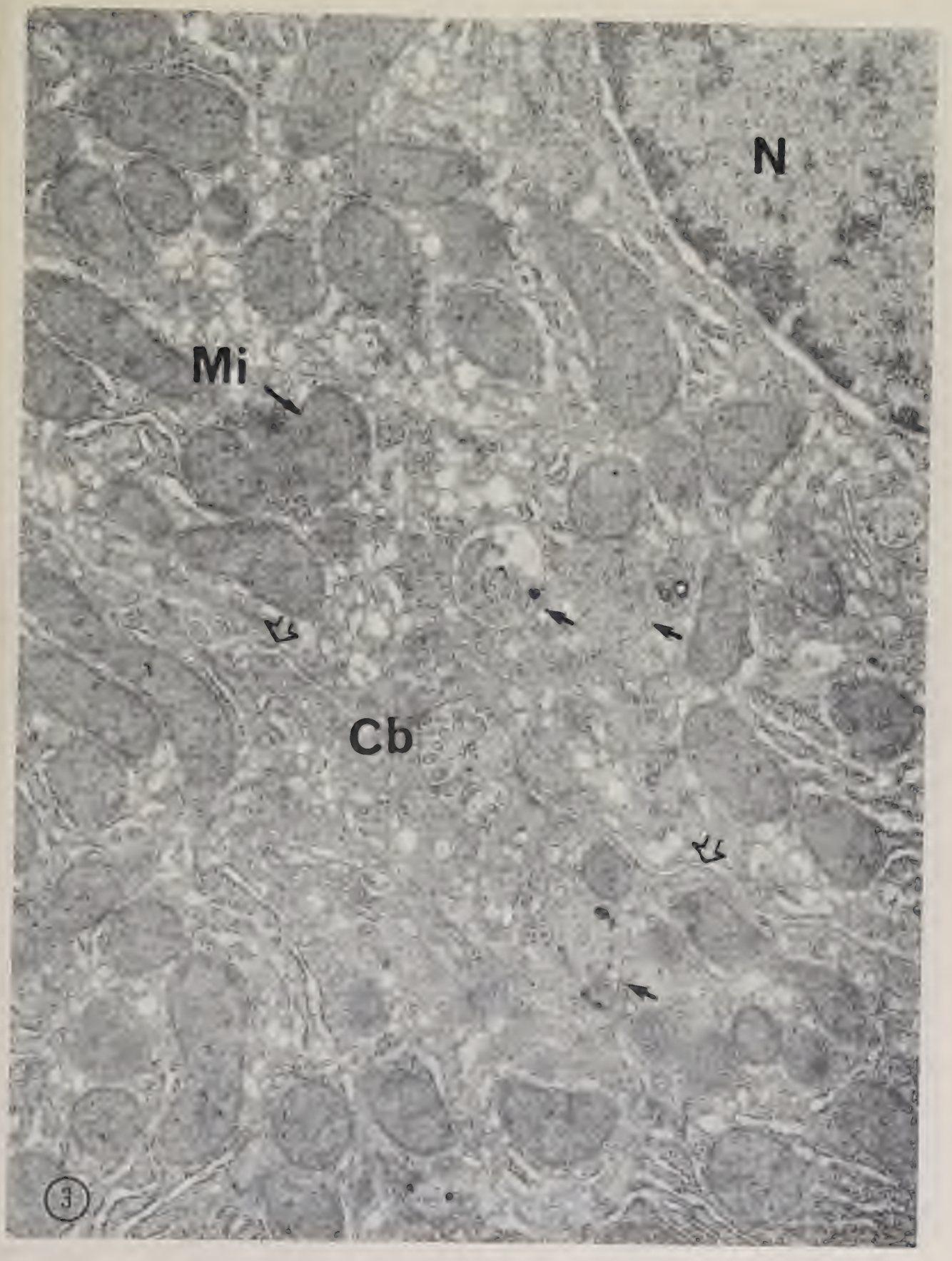

N
Mi
Cb
3

Photo n° 4 : FOIE : Incubation 20 minutes. ß-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

Dans les régions proches des canalicules biliaires (Cb) existent plusieurs lysosomes (↑) donnant une réaction plus ou moins positive. Leur aspect permet de les rattacher aux corps denses péribiliaires de l'ultrastructure hépatique conventionnelle
N_1 = Noyau, Mi = Mitochondrie ×21.000

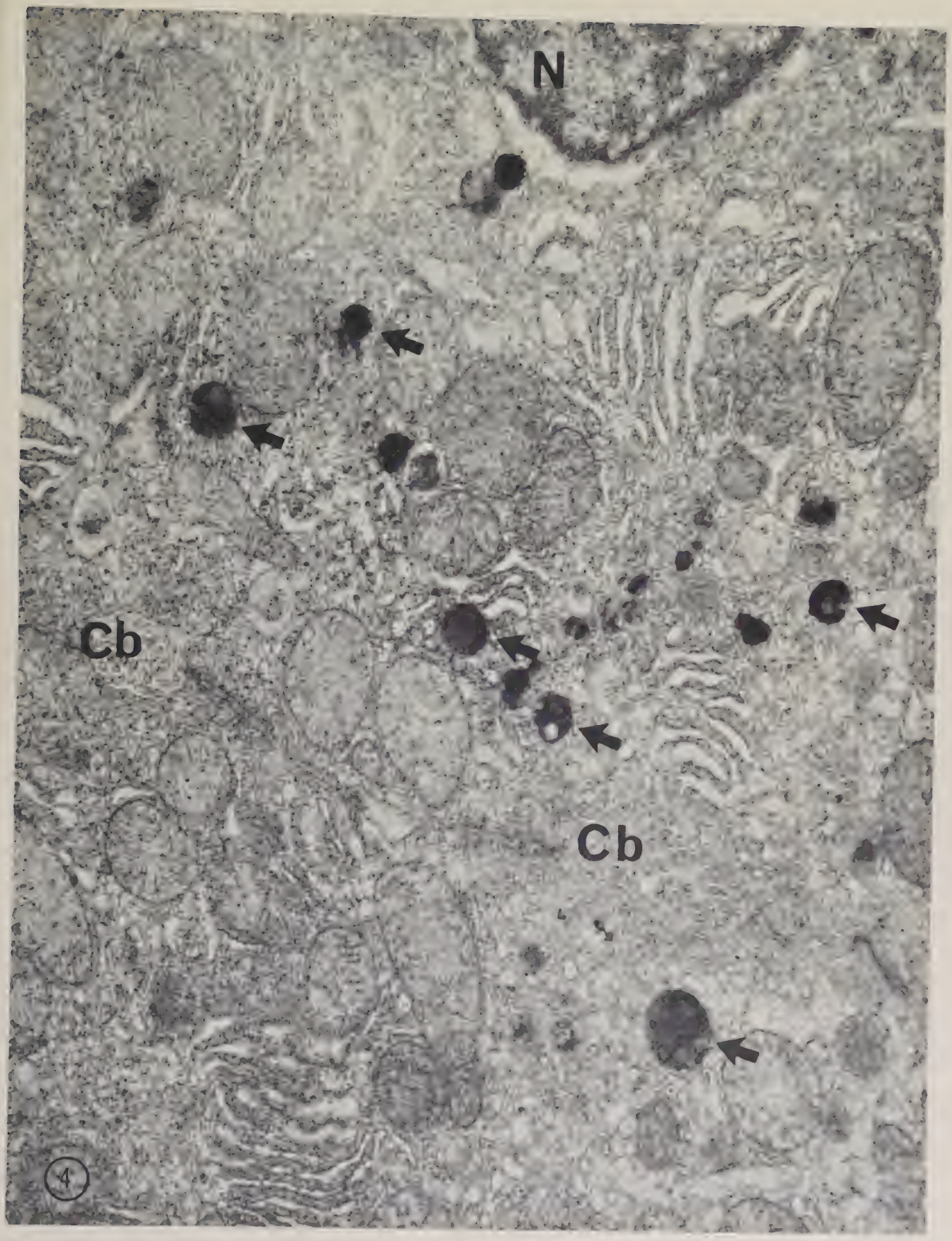

N
Cb
Cb
4

Photo n° 5 : FUNDUS : Témoin sans substrat. Incubation 1 h. 30. pH5, 25°C.

Coupe longitudinale de tubes glandulaires fundiques. Il n'existe pas de réaction positive pour la phosphatase acide. ×300

5

Photo n° 6 : FUNDUS : Incubation 1 h. 30, β-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

Coupe longitudinale de tubes glandulaires fundiques. Les cellules contenant des corpuscules Phosphatase acide-positifs sont surtout localisées à la partie moyenne du tube. Des trois types cellulaires ce sont les cellules pariétales (↑) qui renferment le plus grand nombre de corpuscules positifs.

×300

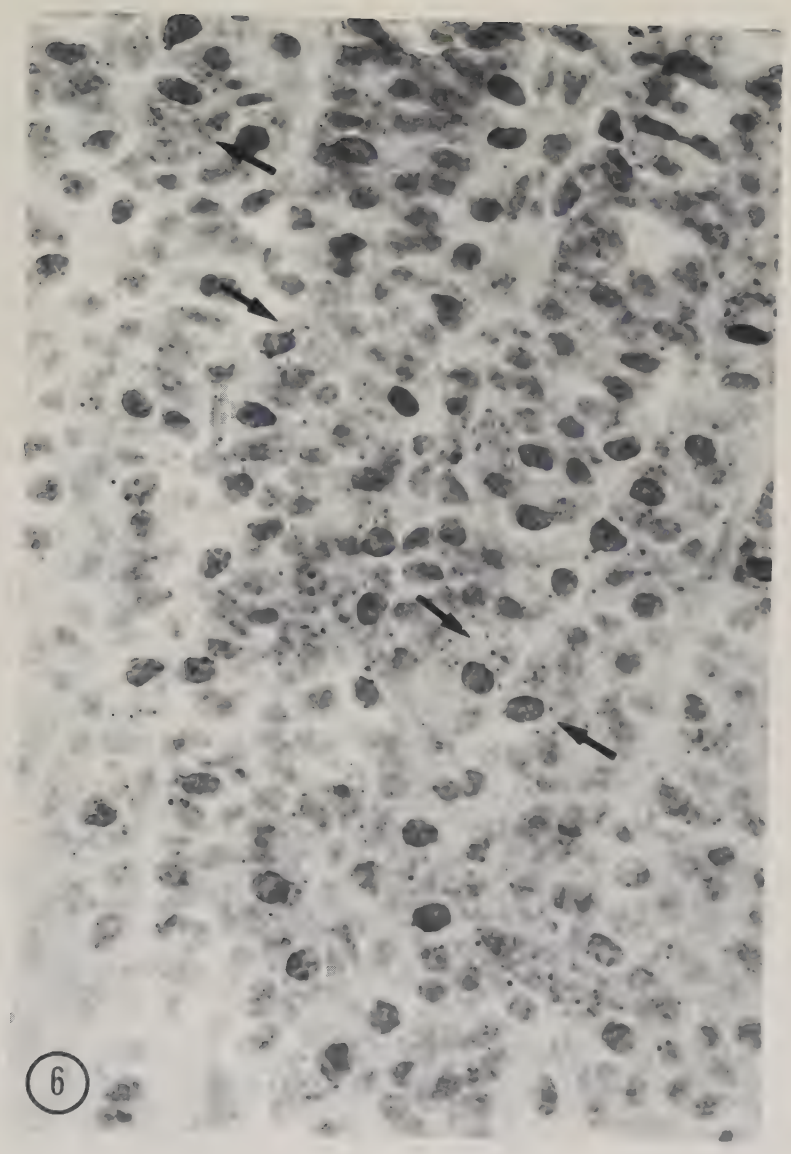

6

Photo n° 7 : FUNDUS : Témoin sans substrat. Incubation 1 h. 30. pH5, 25°C.

Cellule pariétale au repos reconnaissable à ses nombreuses mitochondries (Mi), ses canalicules (Cl), ses "multi-vésicular bodies" (↟) et l'aspect microvésiculaire du réticulum, propre à la cellule non stimulée. N = Noyau. ×14.000

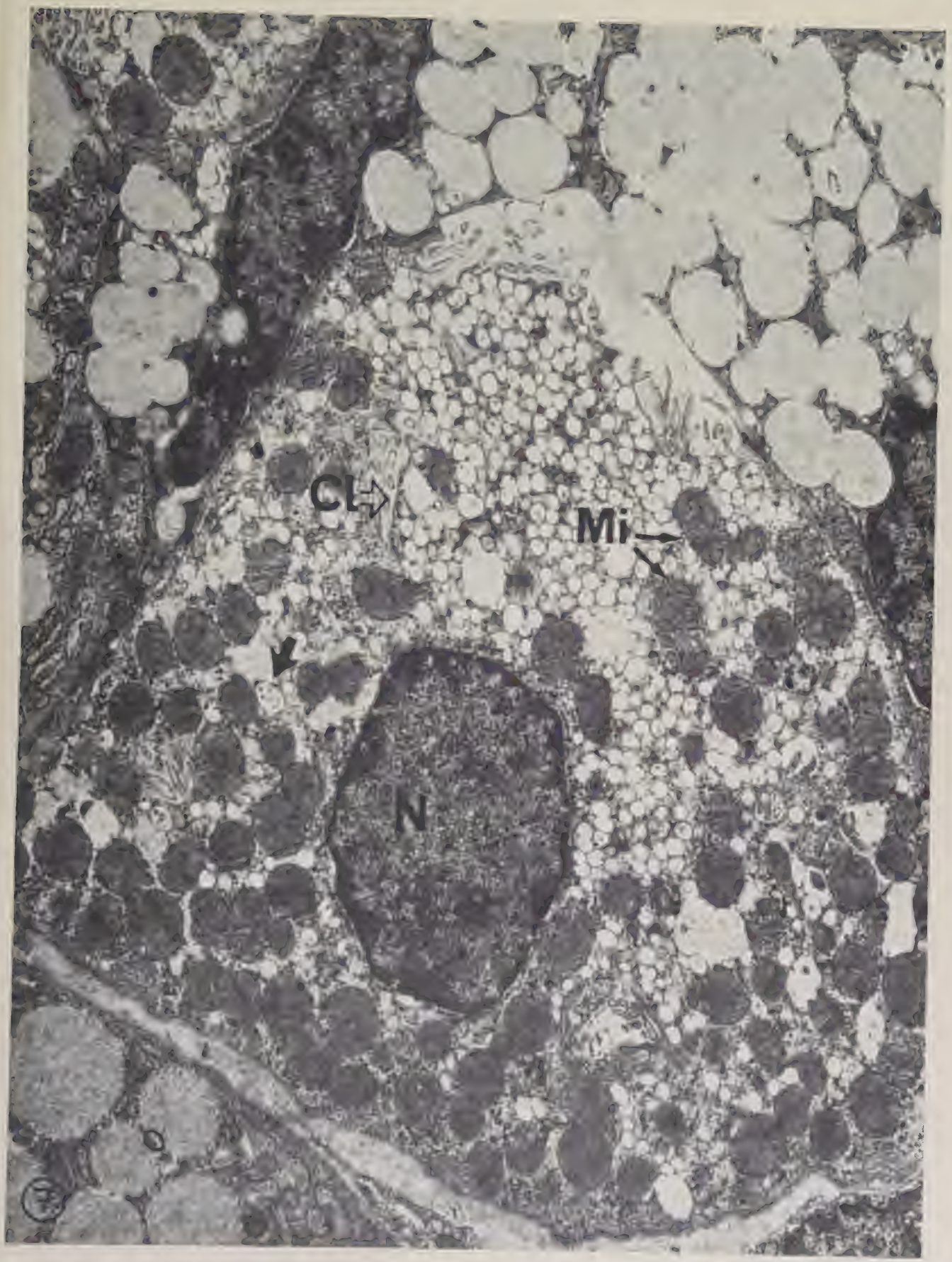

CL
Mi
N

Photo n° 8 : FUNDUS : Incubation 2 heures. ß -Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

Cellule pariétale contenant trois lysosomes (↟). Mi = Mitochondrie, Cl = Canalicule.

×15.000

Mi
Cl
8

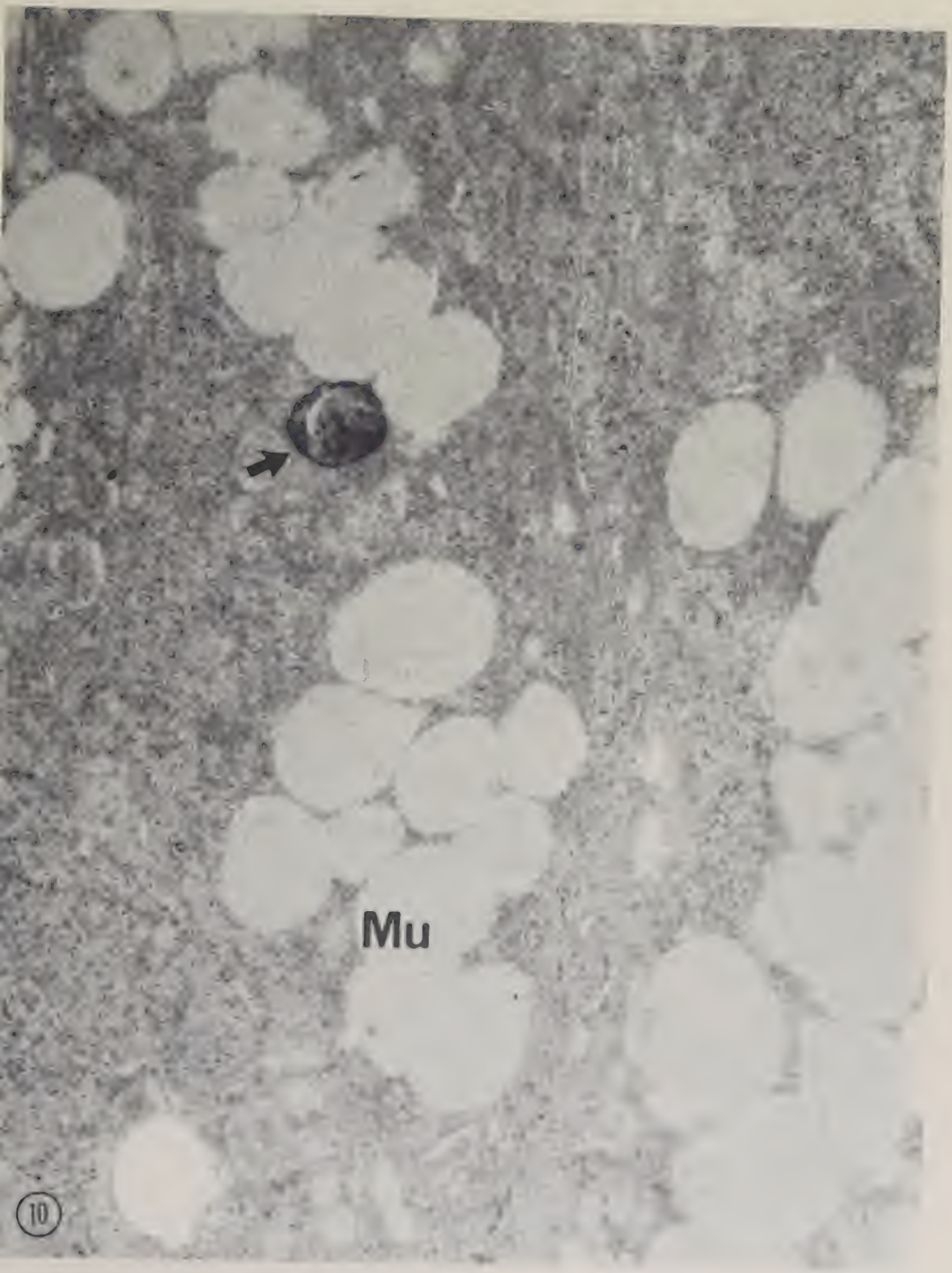
Photo n° 9 : FUNDUS : Incubation 1 h. 30. ß-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

Cellules principales reconnaissables par un réticulum endoplasmique abondant (Re) et des grains de pepsinogène (G). Deux lysosomes (▲) sont présents dans deux cellules adjacentes. N = Noyau. ×22.500

9

Photo n° 10 : FUNDUS : Incubation 2 heures. ß-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

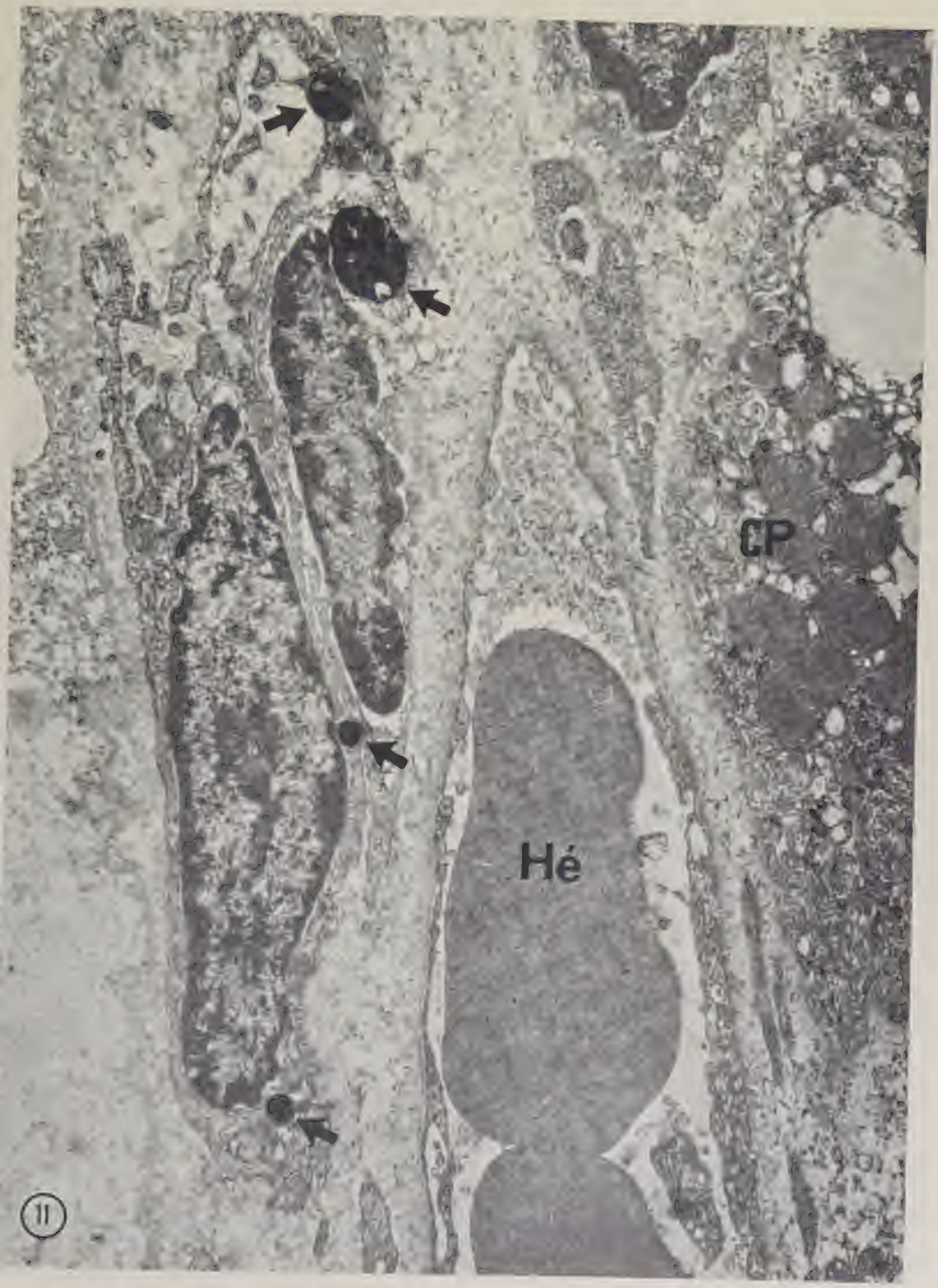
Cellules à mucus du collet contenant des grains de sécretion (Mu). Il existe un lysosome (↟) dans l'une des cellules. ×40.000



10

Photo n° 11 : FUNDUS : Incubation 2 heures. ß -Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

Deux **Fibrocytes** contenant plusieurs lysosomes (♠) séparés d'une cellule pariétale (CP) par un capillaire contenant deux hématies (Hé). ×15.000



(11)

Photo n° 12 : FUNDUS : Incubation 1 heure. β-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.

Cellule endocrine de type IV contenant plusieurs lysosomes ( ). Il existe également un lysosome (⍋) dans une cellule principale adjacente. G = Grain de pepsinogène, N = Noyau. ×17.500

N
G
12

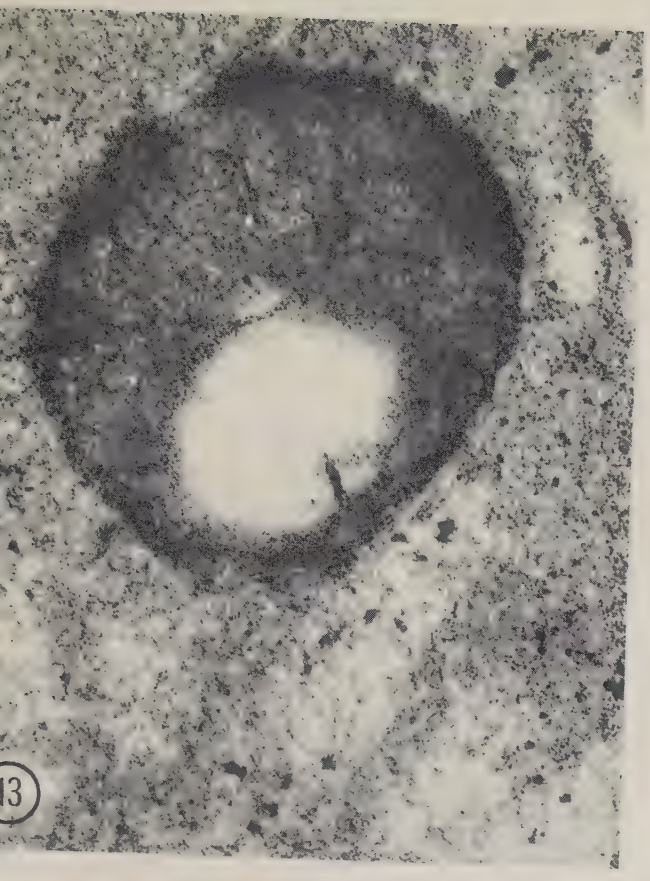
FUNDUS : Incubation 2 heures
ß-Glycérophosphate 2mM, pH5, 25°C.
Réaction positive dans les lysosomes.

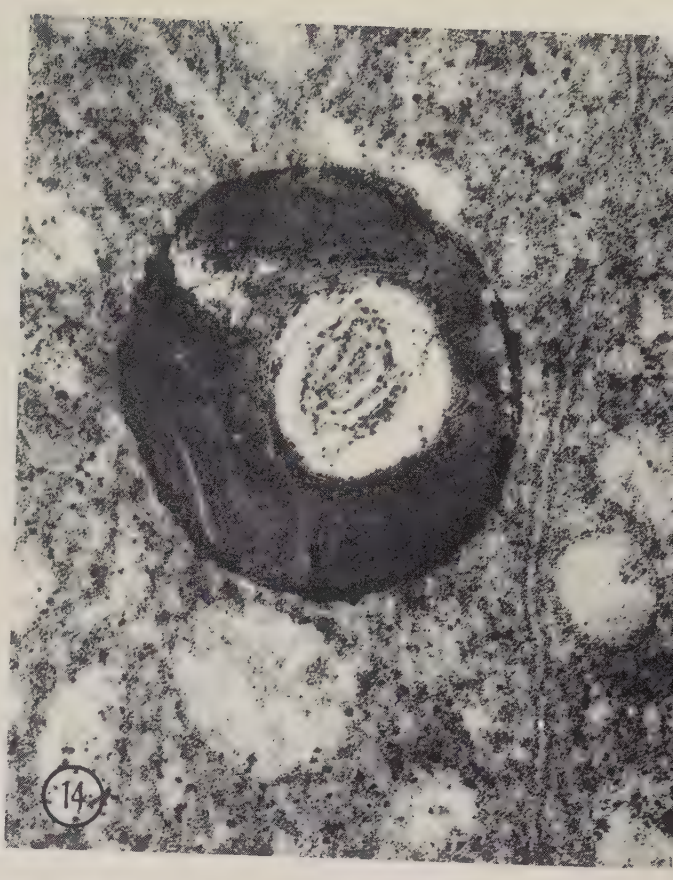
Photo n° 13 : Vacuole intralysosomiale d'un lysosome d'une cellule principale. ×120.000

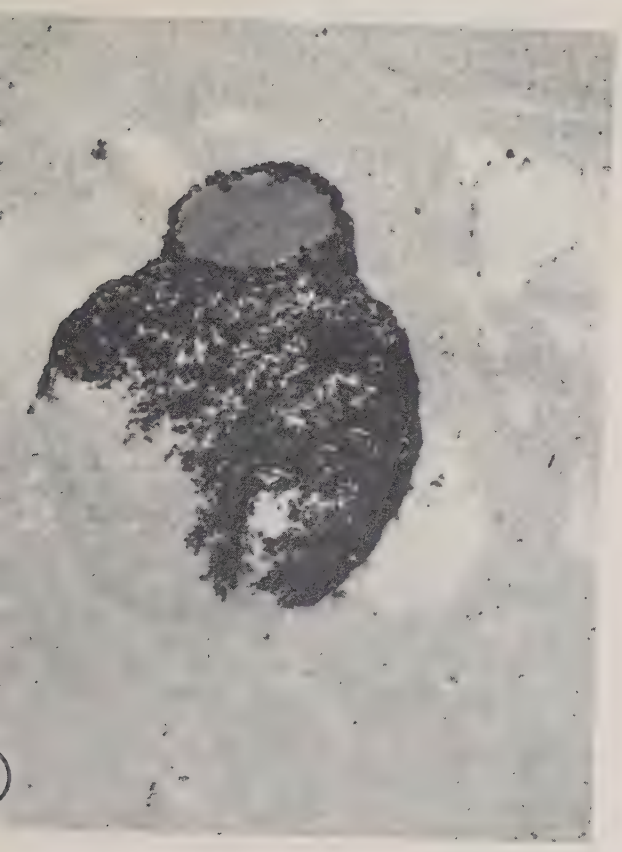
Photo n° 14 : Aspect de digestion intralysosomiale : présence vraisemblable de structures protéiques et lipidiques dans un lysosome d'une cellule principale. ×78.000

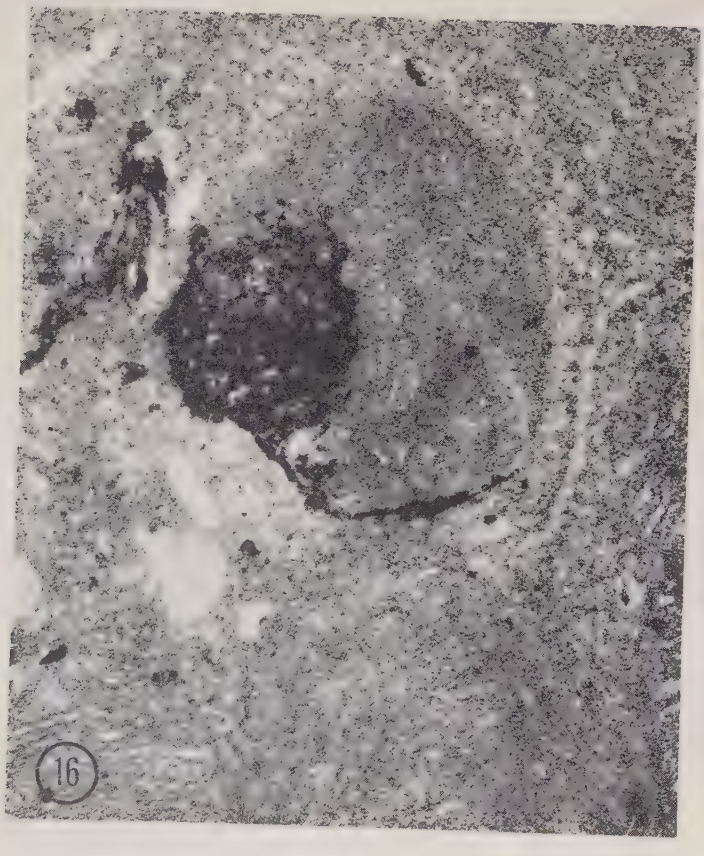
Photo n° 15 : Aspect de "captation" d'un granule par un lysosome d'une cellule endocrine. ×84.000

Photo n° 16 : Lysosome d'une cellule pariétale. ×78.000


13


14




16

BIBLIOGRAPHIE

1. ALDERS RW, DE LORES ARNAIZ R, DE ROBERTIS D : Sodium, potassium activated ATPase and potassium activated p.Nitrophenyl-phosphatase : a comparison of the sub cellular localization in rat brain. Proc Nat Acad Sci (Wash) 53 : 557, 1965

2. ALLISON A : Lysosomes in cancer. In "Lysosomes in biology and pathology", vol II, pp. 178. J.T. Dingle and H.B. Fell Eds, North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1969

3. AMAR COSTESEC A : Le fonctionnement des cellules zymogènes du tube digestif. Un bilan de vingt années d'investigations en biologie cellulaire. Biol Gastroenterol (Paris) 3 : 185, 1971

4. APPELMANS F, WATTIAUX R, DE DUVE C : Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. Biochem J 59 : 438 1955

5. ARONSON JR. NN, DAVIDSON EA : Lysosomal hyaluronidase from rat liver. J Biol Chem 242, I-437, II-441, 1967

6. ASHFORD JP, PORTER KR : Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. J Cell Biol 12 : 198, 1962

7. BARKA T, ANDERSON PJ : Textbook of histochemistry. Theory, practice and bibliography. pp. 238. Harper and Row Inc, New York, London, 1963

8. BARRETT AJ : Properties of lysosomal enzymes. In "Lysosomes in biology and pathology". Vol II, pp. 245. JT Dingle and HB Fell Eds, North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1969.

...

9. BEAUDHUIN P, HERS HG, LOEB H : An electromicroscopic and biochemical study of type II glycogenosis. Lab Invest 13 : 1140, 1964

10. BEAUDHUIN P, EVRARD Ph, BERTHET J : Electron microscopic examination of subcellular fractions. J Cell Biol 32 : 181, 1967

11. BEAUFAY : La centrifugation en gradient de densité. Thèse d'agrégation de l'Enseignement Supérieur. Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgique. Centerick SA Ed., 1966

12. BEAUFAY H, BENDALL DS, BAUDHUIN P, WATTIAUX R, DE DUVE C : tissue fractionation studies. 13 : Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density gradient centrifuging. Biochem J 73 : 628, 1959

13. BEAUFAY H, DE DUVE C : Tissue fractionation studies. Enzymatic release of bound hydrolases. Biochem J 73 : 604, 1959

14. BERNARDI A, BERNARDI G : Studies on acid hydrolases. III : Isolation and properties of spleen acid ribonuclease. Biochim Biophys Acta 129 : 23, 1966

15. BERTHET J : La digestion intracellulaire et les lysosomes. Arch Biol 76 : 367, 1965

16. BOLLET AJ, BONNES WM, NANCE JL : The presence of hyaluronidase in various mammalian tissues. J Biol Chem 238 : 3522, 1963

17. BOWERS WE, DE DUVE C : Lysosomes in lymphoid tissue. Intracellular distribution of acid hydrolases. J Cell Biol 32 : 339, 1967

...

18. BREWER DB, HEATH D : Development of sucrose vacuoles from liver cell lysosomes. J Pathol Bacteriol 87 : 405, 1964

19. CHERSI A, BERNARDI A, BERNARDI G : Studies on acid hydrolases. II. Isolation and properties of spleen acid phosphomonoesteras. Biolchim Biophys Acta 129 : 12, 1966

20. CLAUDE A : Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. I. Problems, methods and preparation of extracts. J Exp Med 84 : 51, 1946

21. CLAUDE A : Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. II. Experimental procedures and results. J Exp Med 84 : 61, 1946

22. COHN ZA, HIRSCH JG : The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule associated components of polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med 112 : 1015, 1960

23. DAEMS WT, VAN RIJSEL TG : The fine structure of the peribiliary dense bodies in mouse liver tissue. J Ultrastruct. Res 5 : 263, 1961

24. DE DUVE C, PRESSMAN BC, GIANETTO R, WATTIAUX R, APPELMANS F : Tissue fractionation studies : VI. Intracellular distribution of enzymes in rat liver tissue. Biochem J 60 : 604, 1955

25. DE DUVE C, WATTIAUX R, WIBO M : Effect of fat soluble compound on lysosomes in vitro. Proc. First Intern. Pharmacol Meeting. 5:97-116, Pergamar Press, Oxford, 1963

26. DE DUVE C, WATTIAUX R : Function of lysosomes. Ann Rev Physiol 28 : 435, 1966

...

27. DELANEY R : Chemical, physical and enzymatic properties of several human ribonucleases. Biochemistry 2 : 438, 1963

28. DICKMAN SR, TRUPIN K : Ribonuclease assay based upon Uridine-phosphate determination. Arch Biophys Biochem 82 : 355, 1959

29. DINGLE JT : Action of the vitamin A on the stability of lysosomes in vitro and in vivo. In "Ciba Foundation Symposium on Lysosomes" pp. 384-398, J A Churchill Ed, London, 1963

30. DINGLE JT : The extracellular secretion of lysosomal enzymes. In "Lysosomes in biology and pathology", Vol II, pp. 421-436, JT Dingle HB Fell Eds, North Holland Publ. Co. Amsterdam, 19

31. DINGLE JT : In "Lysosomes, a Laboratory Handbook", pp. 110, North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1972

32. DIPIETRO DL, ZENGERLE FS : Separation and properties of three Acid Phosphatases from human placenta. J Biol Chem 242 : 3391, 1967

33. ERICSSON JL : Mechanism of cellular autophagy. In "Lysosomes in Biology and pathology", Vol II, pp. 345, JT Dingle and HB Fell Eds, North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1969

34. FELL HB, DINGLE JT : Studies on the mode of action of excess of vitamin A. G : Lysosomal protease and the degradation of cartilage matrix. Biochem J 87 : 403, 1963

35. FISHMAN WH, GOLDMAN SS, DELELLIS R : Dual localization of β-Glucuronidase in endoplasmic reticulum and in lysosomes. Nature (Lond) 213 : 457, 1967

36. FISKE CH, SUBBAROW Y : Colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 66 : 375, 1925

...

37. FORSSMANN WG, ORCI L, PICTET R, RENOLD AE, ROUILLER C : The endocrine cells in the epithelium of gastrointestinal mucosa of the rat. J Cell Biol 40 : 692, 1969

38. GOLDFISCHES S : The cytochemical demonstration of lysosomal arylsulfatase activity by light and electron microscopy. J Histochem Cythochem 13 : 520, 1965

39. GOMORI G : An improved histochemical technic for Acid phospha tase. Stain Technol 25 : 81, 1965

40. GOMORI G : In "Microscopic histochemistry", pp. 189-198, Uni- versity of Chicago Press, Chicago, 1952

41. HAYASHI M, NAKAJIMA N, FISHMAN W : The cytologic demonstratio of β-glucuronidase employing Naphtol AS BI Glucuronide and hexazonium pararosanilin. J Histochem Cytochem, 12 : 293, 19

42. HAYASHI M : Histochemical demonstration of N Acetyl βglucosam nidase employing Naphtol AS BI N-Acetyl βglucosaminide as substrate. J Histochem Cytochem 13 : 355, 1965

43. HAYASHI M : Comparative histochemical localization of lysosom enzymes in rat tissues. J Histochem 15 : 83, 1967

44. HELANDER HF : Ultrastructure of gastric fundus gland of refed mice. J Ultrastruct Res 10 : 160, 1964

45. HELMINEN HJ, ERICSSON JL : On the mechanism of lysosomal enzy secretion. Electron microscopic studies on the epithelial cel of the rat's ventral prostate lobe. J Ultrastruct Res 33 : 52 1970

46. HERS HG : αglucosidase deficiency in generalized glycogen sto rage disease (Pompe's disease). Biochem J 86 : 11, 1963

...

47. HERS HG, VAN HOOF F : Genetic abnormalities of lysosomes. IN "Lysosomes in biology and pathology". Vol. II, pp. 19-40, JT Dingle HB Fell Eds, North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1969

48. HIRSCH JG : Cinemicrophotographic observations on granule lysis in poly morphonuclear leucocytes during phagocytosis. J Exp Med 116 : 827 (1962)

49. HIRSCH JG, BERNHEIMER AW, WEISSMANN G : Motion picture study of the toxic action of streptolysins on leucocytes. J Exp Med 118 : 223, 1963

50. HIRSCHHORN R, TROLL W, BRITTINGER G, WEISSMANN G : Template activity of nuclei from stimulated lymphocytes. Nature (Lond) 222 : 1247, 1969

51. HOLT SJ : Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori Acid phosphata technique. Exp Cell Res, suppl 7 : 1, 1959

52. HUTTERER F : Degradation of mucopolysaccharides by hepatic lysosomes. Biochim Biophys Acta 115, 312, 1966

53. IGARASHI M, HOLLANDER VP : Acid phosphatase from rat liver. J BIOL CHEM, 243 : 6084, 1968

54. ITO S, WINCHESTER RJ : The fine structure of the gastric muco sa in the rat. J Cell Biol 16 : 541, 1963

55. JOSEFSSON L, LAGERSTEDT S : In "Methods of biochemical analysis" vol. 9, pp. 39, D. Glick Ed, Interscience, New York,196

56. JUNGALWALA FB, ROBINS E : Glycosidases in the nervous system. J Biol Chem 243 : 4258, 1968

...

57. KUSHINSKY SV, CHEN LP, OTTERNESS I : Activity of βglucuronidase. Nature (Lond) 214 : 142, 1967

58. LAWN AM : Observation of the fine structure of the gastric parietal cell of rat. J Biophys Biochem Cytol 7 : 161, 1960

59. LEVY GA, McCALLAN A, MARSH CA : Purification of βglucuronidase from the preputial gland of femal rat. Biochem J 69 : 22, 1958

60. LOWRY OH, ROSENBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 307, 1965

61. MAVER ME, GRECO AE : The chromatographic separation and characterization of the acid and alcaline ribonuclease of bovine spleen and liver. J Biol Chem 237 : 736, 1962

62. MILLER F, PALADE GE : Lytic activities in renal protein absorption droplets. J Cell Biol 23 : 519, 1964

63. MUSA BU, DOE RP, SEAL US : Purification and properties of human liver βglucuronidase. J Biol Chem 240 : 2811, 1965

64. NEIL MW, HORNER MW : Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissue : Acid p-Nitrophenyl phosphate phosphohydrolase of adult guinea pig liver. Biochem J 92 : 217, 1964

65. NEIL MW, HORNER MW : Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissue : Acid phénylphosphomonoesterase of adult mouse liver. Biochem J 92 : 220, 1964

66. NOVIKOFF AB, BEAUFAY H, DE DUVE C : Electron microscopy of lysosomes - rich fractions from rat liver. J Biophys Biochem Cytol 4 : 179, 1956

...

67. NOVIKOFF AB : Lysosomes and related particles. In "The cell" vol II, pp. 423-488. J Brachet and AE Mirski eds, Academic press, London, 1961

68. NOVIKOFF AB : Lysosomes in the physiology and pathology of cells : contributions of staining methods. Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, pp. 36-73. A Churchill Ed., London, 1963

69. NOVIKOFF AB, ESSNE E, QUINTANA N : Golgy apparatus and lysosomes. Fed Proc 23 : 1010, 1964

70. NOVIKOFF AB, SHIN WY : The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies : Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. J Microscopic 3 : 187 1964

71. ONURA T, SIEKEVITZ D, PALADE GE : Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes in rat hepatocytes. J Bio Chem 242 : 2389, 1967

72. RAGINS H, DITTBRENNER M, DIAZ F, STATE D : Variations in the cellular distribution of acid phosphatase in canine gastric mucosa with a comparison of the lead sulfide and azo-dye methods. Gastroenterology 46 : 278, 1964

73. ROBINSON D, ABRAHAMS HE : β-D-Xylosidase in pig Kidney. Bioch Biophys Acta 132 : 212 ; 1967

74. ROMEO D, DE BERNARD B : Purification and properties of beef Heart β-Glucuronidase . Biochim Biophys Acta 159 : 194, 1968

75. RUBIN W : An unusual intimate relationship between endocrine cells and other types of epithelial cells in the human stomac J Cell Biol 52 : 219, 1972

...

76. RUDZINSKA MA : The use of protozoar for studies on aging III. Similarities between young overfed and old normaly fed Tokophrya Infusionum : a light and electron microscopic study. Gerontologia 6 : 206, 1962

77. SAWANT PL, SHIBKO S, KUMTA US, TAPPEL AL : Isolation of rat-liver lysosomes and their general properties. Biochim Biophys Acta 85 : 82, 1964

78. SHIBKO S, TAPPEL AL : Rat kidney lysosomes. Isolation and properties. Biochem J : 95 : 731, 1965

79. SMITH JK, WHITBY LG : The heterogeneity of prostatic acid phosphatase. Biochim Biophys Acta 151 : 607, 1968

80. SCHMIDT G : In "Enzymes", vol 5, pp. 37, P. Boyer, H HARDY and K MYRBAKC Eds, Academic Press, New York, 1961

81. SOUMARMON A : Dosage de l'activité 5'Nucleotidasique de broyats de muqueuse fundique de rat. DEA de Biochimie, 1971-1972, Paris

82. STAHL P, TOUSTER O : β-Glucuronidase of rat liver lysosomes. J Biol Chem 246 : 5398, 1971

83. STRAUS W : Lysosomes, phagosomes and related particles. In "Enzymes Cytology", pp. 253-258, DB Roodyn Ed, Academic Press, London, New York, 1967

84. TAN YH, BOWNESS JM : Canine submandibullar gland hyaluronidase. Biochem J 110 : 9, 1968

...

85. VAES G : Studies on bone enzymes : the activation and release of latent acid hydrolases and catalase in bone tissue homogenates. Biochem J 97 : 393, 1965

86. VAES G : Hyaluronidase activity in lysosomes of bone tissue. Biochem J 103 : 802, 1967

87. VAES G, JACQUES P : Studies on bone enzymes : the assay of acid hydrolases and other enzymes in bone tissue. Biochem J 97 : 380, 1965

88. VAES G, JACQUES P : Studies on bone enzymes : distribution of acid hydrolases, alkaline phenyl-phosphatase, cytochrome oxydase and catalase in subcellular fraction of bone tissue homogenate. Biochem J 97 : 389, 1965

89. VARUTE AT : Dual cytologic localization of β-Glucuronidase in some organ-tissues of anuran tadpoles in metamorphosis. Acta Histochem 38 : 227, 1970

90. VERITY MA, BROWN WJ : Activation and stability of lysosomal acid phosphatase. Biochim Biophys Acta 151 : 284, 1968

91. WATTIAUX R, WIBO M, BAUDHUIN P : Influence of the injection of Triton WR 1339 on the properties of rat liver lysosomes. In "Ciba Foundation Symposium on Lysosomes", pp. 176-196, J A Churchill ed, London, 1963

92. WEISSMANN G, THOMAS L : The effect of corticosteroids upon connective tissue and lysosomes. Rec Progr Horm Res 20 : 215, 1964

93. WINBORN WB, BOCKMAN DE : Electron microscopic observation of dense bodies of the parietal cell of hamster. Anat Rec 159 : 387, 1967

94. WINBORN WB, BOCKMAN DE : Origin of lysosomes in parietal cells. Lab Invest 19 : 256, 1968